

P01257 US

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung DE 198 57 529.7 über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 198 57 529.7

**Anmeldetag:** 14. Dezember 1998

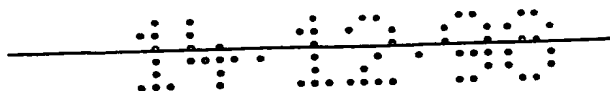
**Anmelder/Inhaber:** Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung  
des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg/DE

**Bezeichnung:** Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung  
optischer Eigenschaften, insbesondere von  
Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten,  
von auf einem Träger gebundenen Molekülen,  
insbesondere biologischen Molekülen

**IPC:** G 01 N 21/63, G 01 N 21/76, G 01 N 21/64,  
C 12 Q 1/00, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/483

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der Teile der am 14. Dezember 1998 eingereichten Unterlagen dieser Patentanmeldung unabhängig von gegebenenfalls durch das Kopierverfahren bedingten Farbabweichungen.

München, den 17. August 2010  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Die Präsidentin  
Im Auftrag



5

- 1 -

Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer Eigenschaften,  
insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten, von  
auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen  
Molekülen

5  
Die Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung  
optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und  
Brechungsverhalten, von auf einem Träger gebundenen Molekülen,  
insbesondere biologischen Molekülen. Dabei wird hier der Begriff  
10 "Eigenschaften" im weitesten Sinne verstanden und soll nicht nur die für  
bestimmte Moleküle charakteristischen Eigenschaften, wie zum Beispiel  
deren Massenspektrogramm, umfassen, sondern zum Beispiel auch die  
Fähigkeit, überhaupt – nämlich durch das bloße Vorhandensein – eine  
bestimmte Reaktion zu zeigen, so daß die Erfindung also auch solche  
15 Verfahren und Vorrichtungen betrifft, bei denen aus einer bestimmten  
optischen Reaktion zunächst nur auf das bloße Vorhandensein eines Stoffes  
- nicht aber dessen Art - geschlossen werden soll (wobei dann die Art des  
Stoffes zum Beispiel aus dessen Position auf dem Träger ermittelt wird).  
Unter dem Begriff "biologische" Moleküle werden hier alle Arten von in  
20 der Biologie, der Pharmazie und der Medizin besonders relevanten  
Molekülen verstanden, also z.B. Peptide, D-Peptide, L-Peptide und  
Mischungen daraus, natürlich vorkommende Oligonukleotide, ihre  
Spiegelbilder und Mischungen daraus, künstlich derivatisierte Oligonukleo-  
tide, wie sie zum Aufbau von Aptameren eingesetzt werden, Oligosac-

charide und Modifikationen der genannten Moleküle. Insbesondere modular aufgebaute Oligomere, die nicht in der Natur vorkommen, können dabei besondere pharmakologische Relevanz besitzen. Besonders seien in diesem Zusammenhang auch mithilfe chemischer Kombinatorik herzustellende nichtnatürliche Substanzen erwähnt, die als Liganden von biologischen Molekülen eingesetzt werden können, insbesondere organische Verbindungen, Steroidderivate usw. Aus einer Vielzahl solcher Moleküle können spezifische Binder für ein natürlich vorkommendes Molekül isoliert werden, die die Aktivität dieses Moleküls modifizieren. Da diese Binder dann jedoch oft von natürlich vorkommenden Verdauungsenzymen nicht gespalten werden können, eignen sie sich in besonderem Maße für den Einsatz als Therapeutikum.

Solche Verfahren und Vorrichtungen sind in unterschiedlichster Form bekannt, weisen jedoch sämtlich bestimmte Nachteile auf. So benötigen die bekannten Verfahren zu ihrer Durchführung aufwendige und teure Spezialgeräte und sind vergleichsweise langsam im Auslesen eines Lumineszenzsignals. Insbesondere wenn – was, wie nachfolgend noch erläutert wird, aus unterschiedlichen Gründen vorteilhaft ist – sehr viele unterschiedliche Molekülgruppen auf einem gemeinsamen Träger angeordnet und einzeln zu untersuchen sind, muß zum Anfahren der einzelnen Molekülgruppen eine sehr aufwendige Mechanik verwendet werden, die nicht nur teuer und stör anfällig ist, sondern die auch bei höchster Präzisionsarbeit immer Fertigungstoleranzen aufweist, die um etliche Größenordnungen höher liegen, als die für eine Untersuchung ausreichende minimale Größe der Molekülgruppen. Dadurch ist die Anzahl der auf einem Träger maximal unterzu-

bringenden Moleküle bzw. Molekülgruppen bei den bekannten Verfahren und Vorrichtungen begrenzt und liegt etwa in der Größenordnung einiger  $10^5$  Molekülgruppen. Insbesondere für bestimmte Blutserums- oder DNA-Analysen wäre es jedoch wünschenswert, wenn auf einem Träger etwa  $10^8$  bis  $10^9$  Moleküle aufgebracht und untersucht werden könnten.

Zum Aufbringen der Moleküle auf die jeweiligen Träger, insbesondere auf sogenannte "Diagnostik-Chips", sind lithographische Methoden bekannt, wobei jedoch – ähnlich wie bei der späteren Untersuchung – die schwierige exakte Zuordnung von Molekül und wiederholbar gezielt anfahrbarer Trägerposition die Zahl der maximal aufbringbaren Moleküle begrenzt, denn es genügt nicht, sehr viele unterschiedliche Moleküle dicht gepackt auf einem Träger anzuordnen, ohne jedoch wiederholbar genau zu wissen, welche Moleküle sich an welcher Position auf dem Träger befinden. Insbesondere ist es bei den bekannten Verfahren und Vorrichtungen ein Problem, sehr viele Lumineszenzreaktionen auf einem Träger in angemessener Zeit und gleichzeitig auch sehr genau auszulesen. Bei den mit den hier betroffenen Verfahren und Vorrichtungen vorteilhaft durchführbaren Färbeuntersuchungen, bei denen ein zu untersuchender Stoff auf den Träger, auf dem zuvor bereits unterschiedliche Moleküle verankert worden sind, aufgebracht wird, sollen Rückschlüsse auf die in dem zu untersuchenden Stoff vorhandenen Substanzen, wie z.B. bestimmte Antikörper in einem Blutserum, daraus gezogen werden, mit welchen der auf dem Träger verankerten Moleküle der Stoff bzw. dessen Bestandteile Bindungen eingegangen sind, so daß man sehr genau wissen muß, welches Molekül sich wo auf dem Träger befindet.

Schließlich können bei den bekannten Vorrichtungen und Verfahren die einmal aufgetragenen Moleküle in der Regel gar nicht oder nur mit sehr großem Aufwand wieder abgelöst werden. Insbesondere wenn sich auf dem Träger eine sehr große Zahl von Molekülen (eine "Molekülbibliothek") befindet, die mit einem zu untersuchenden Stoff oder einem Gemisch von Stoffen (einer zweiten "Molekülbibliothek", zum Beispiel einem Proteingemisch) in Verbindung gebracht worden ist, wäre es oftmals wünschenswert, die Bindungspartner aus der zweiten Molekülbibliothek, also die Moleküle, die Bindungen mit Molekülen der ersten Molekülbibliothek eingegangen sind, gezielt von dem Träger ablösen und einer weiteren Untersuchung unterziehen zu können. Dies ermöglichte dann die parallele Identifizierung von Bindungspartnern aus den beiden Molekülbibliotheken, wobei der Bindungspartner aus der ersten Molekülbibliothek jeweils durch seine Position auf dem Träger bekannt ist, während der Bindungspartner aus der zweiten Molekülbibliothek nach der gezielten Ablösung von dem Träger identifiziert werden kann. Besonders vorteilhaft wäre es dabei, wenn zunächst diejenigen trägergebundenen Moleküle identifiziert werden könnten, die überhaupt Moleküle aus der zweiten Molekülbibliothek gebunden haben.

Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, verbesserte Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen anzugeben, die zudem preisgünstig herstell- bzw. durchführbar sind. Nach

Möglichkeit sollen die Verfahren und Vorrichtungen auch noch besonders schnell durchführbar sein bzw. besonders schnell arbeiten.

5 Die Aufgabe wird zum einen gelöst von einem Verfahren zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger gebundenen Molekülen, wobei elektromagnetische Wellen, insbesondere Laserlicht, auf den Träger eingestrahlt und im wesentlichen nur das von den Molekülen eventuell emittierte Licht von dem Detektor erfaßt wird. Dies hat gegenüber den bekannten Verfahren, die in der Regel nach dem Prinzip des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops arbeiten, bei welchen ein Teil des gestreuten  
10 Anregungslichts auch auf den Detektor gelangt, den Vorteil, daß tatsächlich nur das emittierte Licht erfaßt und damit ein wesentlich verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt wird. Es sei an dieser Stelle betont, daß unter dem Begriff "Licht" hier alle Arten von elektromagnetischen Wellen verstanden werden, insbesondere also auch Wellen mit außerhalb des im  
Empfindlichkeitsbereich des menschlichen Auges liegenden Wellenlängen.

Um nun ohne aufwendige Blenden o. dgl. sicherzustellen, daß tatsächlich möglichst nur das emittierte Licht zum Detektor gelangt bzw. von diesem erfaßt wird, kann zum einen so vorgegangen werden, daß die elektromagnetischen Wellen nur kurzzeitig, insbesondere gepulst, auf den Träger  
20 eingestrahlt werden und daß der Detektor während des Einstrahlens eventuell von den bestrahlten Molekülen emittiertes Licht nicht erfaßt, wobei hier unter dem Begriff "Erfassen" das Feststellen einer meßbaren Größe einschließlich des Erzeugens entsprechender, für die jeweilige Untersuchung verwertbarer Signale verstanden wird, so daß also auf den

eigentlichen Sensor des jeweiligen Detektors sehr wohl Licht gelangen kann, das nicht von einer Lumineszenz-Reaktion herrührt, solange nur - z.B. durch Abschalten der dem Sensor nachgeschalteten Detektionseinrichtungen, insbesondere also der Signalerzeugung und -auswertung während des Einstrahlens der zur Lumineszenz anregenden elektromagnetischen Wellen - sichergestellt ist, daß dieses Licht nicht in störende Signale umgewandelt wird. Es sei an dieser Stelle betont, daß durch das kurzzeitige Anregen und das zeitlich verzögerte Auslesen der Lumineszenzreaktion in den Dunkelphasen der Anregung, das Signal- Rauschen-Verhältnis für alle Arten von Fluoreszenzmessungen verbessert werden kann, insbesondere bei Fluoreszenzmessungen nach dem Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops, bei der Detektion von chromatographisch aufgetrennten fluoreszenzmarkierten Molekülen, insbesondere beim Sequenzieren von DNA, und beim Fluoreszenz-aktivierten Zell-Sorter oder Zell-Scanner (FACS). Dies kann alternativ oder zusätzlich zum gepulsten Einstrahlen der Wellen in besonders vorteilhafter Weise dadurch erzielt werden, daß der Detektor und der Träger nach dem Einstrahlen oder während des Einstrahlens der elektromagnetischen Wellen relativ zueinander bewegt werden, insbesondere relativ zueinander gedreht werden, so daß sich die mit den elektromagnetischen Wellen bestrahlten Moleküle in einem von dem Detektor erfassbaren Bereich bewegen. Schließlich können auch mehrere Lichtquellen und mehrere Detektoren verwendet werden, die wechselweise an- und abgeschaltet werden, so daß es vorteilhaft möglich wird, Moleküle in bestimmten Bereichen auf dem Träger durch Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen zur Lumineszenz anzuregen und gleich-

zeitig oder zeitversetzt eventuelle Lumineszenzreaktion aus anderen, zuvor angeregten Bereichen des Trägers zu erfassen.

Ein weiterer Ansatz das Signal-Rausch-Verhältnis von Lumineszenzsignalen zu verbessern gründet auf die Topographie eines Mischarrays von  
5  
einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen mit Leuchtdioden. Die einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden werden dabei in Vertiefungen angeordnet, so daß das von Ihnen abgestrahlte Licht nur bei benachbarten Siliziumerhebungen eine Lumineszenzreaktion anregt. Natürlich kann auch die  
10  
Topographie des beschriebenen Mischarrays mit kurzzeitiger Anregung der Lumineszenzreaktion und einem Auslesen der Signale in der Dunkelphase verbunden werden. Die kurzzeitige Anregung von Fluoreszenzmolekülen ermöglicht darüber hinaus auch eine besonders einfache Zuordnung von Fluoreszenzsignalen an einzelne Moleküle einer Molekülbibliothek, wenn diese auf ein Array von Detektoren aufgebracht werden. Der in den  
15  
Dunkelphasen der Anregung aufgrund der Lumineszenz der Moleküle entstehende Strom kann parallel in den einzelnen Photodetektoren ausgelesen werden und damit den einzelnen Mitgliedern der Molekülbibliothek zugeordnet werden.

20  
Sowohl durch das beschriebene gepulste Einstrahlen/gepulste Detektieren als auch durch das Bewegen von Träger und Detektor relativ zueinander und durch das wechselweise Betreiben mehrerer Lichtquellen und Detektoren wird vorteilhaft eine Entkopplung von Anregung und Detektion erreicht, was gegenüber den bekannten Verfahren zu einem erheblich klareren Lumineszenzsignal und damit zu einem verbesserten Signal-Rausch-



Verhältnis führt. Letzteres kann noch weiter verbessert werden, wenn zwischen den Träger und den Detektor bzw. die Detektoren ein oder mehrere Wellenlängenfilter geschaltet werden, was es erlaubt, auch eventuelles Streulicht des zur Anregung benutzten Lichts vom Fluoreszenzlicht zu trennen.

5

Zur Lösung der Aufgabe wird ferner ein Verfahren zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen, angegeben, wobei elektromagnetische Wellen auf den Träger eingestrahlt, die bestrahlten Moleküle mit einem Detektor beobachtet werden, ausgewählte Moleküle von dem Träger automatisch abgelöst und einem zweiten Detektor zur Erfassung weiterer, nicht notwendigerweise optischer, Eigenschaften zugeführt werden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß nach einem ersten Analyseschritt (z.B. einer an sich bekannten Färbereaktion), bei dem bestimmte Moleküle mit auf dem Träger bereits zuvor gebundenen Molekülen Bindungen eingegangen sind und so neue Molekülkomplexe gebildet wurden, diese neuen Molekülkomplexe gezielt weiter untersucht werden können, wobei vom zweiten Detektor z.B. ein Massenspektrogramm der abgelösten Molekülkomplexe erzeugt werden kann.

10

20

Dabei kann so vorgegangen werden, daß die ausgewählten Moleküle durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, insbesondere durch Einstrahlung von Laserlicht, von dem Träger abgelöst werden, was für eine sehr große Zahl von Proben verhältnismäßig einfach und kostengünstig umgesetzt werden kann.

In besonders vorteilhafter Weise kann für die Ablösung von ausgewählten Molekülen ein Mischarray von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen und Leuchtdioden verwendet werden. Die einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden dienen dabei zum anregen benachbarter fluoreszenzmarkierter Moleküle und mit der Identifizierung von Bindungsereignissen zur Vorauswahl, welche Moleküle von dem Träger abgelöst und einem zweiten Detektor zugeführt werden sollen. Befinden sich diese Moleküle auf einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen, so können diese sehr einfach, insbesondere durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von dem Träger abgelöst werden.

So kann z.B. im Massenspektrometer der zunächst nicht bekannte Bindungspartner aus einer zweiten Molekülbibliothek an ein durch die Position auf dem Träger bereits bekanntes Mitglied aus der ersten Molekülbibliothek bestimmt werden, und zwar auch für mehrere Mitglieder parallel. Die Identität des Bindungspartners aus der zweiten Molekülbibliothek erhält man z.B. durch den Vergleich der Masse (oder tryptischer Spaltstücke eines gebundenen Proteins) mit den bekannten Sequenzen aus einem bereits sequenzierten Genom. Ein weiteres Beispiel ist die Ablösung eines rekombinanten Phagenantikörpers, der durch sein oberflächen-exprimierten Fv-Antikörper ein bekanntes Antigen gebunden hat. Mit diesem Phagenantikörper kann ein E.coli Bakterium infiziert und der rekombinante Antikörper anschließend produziert werden.

Ein weiteres Beispiel ist die Sequenzierung komplexer DNA mittels Festphasen-gekoppelter Oligos, bei der "in situ", d.h. parallel bei Millionen

verschiedener Oligos eine Sequenzierungsreaktion stattfindet. Verändert wird dabei das ursprünglich auf den Träger gekoppelte Oligo, es wird mit Hilfe einer Polymerase und eines Templates verlängert, bis ein von der Polymerase eingebautes ddNTP zum Kettenabbruch führt. Anstelle des ursprünglich gekoppelten Oligos erhält man eine Schar von etwas längeren Oligos, die beispielsweise durch ein ddC terminiert sind. Diese Schar von veränderten Oligos muß man vom Template (z.B. durch Erhitzen) und dann noch vom Träger (beispielsweise durch den Einbau einer S=S-Brücke in das Verbindungsstück zum Träger, die mit Hilfe von reduzierenden Agentien wie Mercaptoethanol spaltbar ist) abtrennen. Das Massenspektrometer ermittelt dann die Massen der einzelnen Mitglieder dieser Schar von ddC terminierten Oligos und durch den Vergleich mit den erwarteten Massen die Sequenz der Verlängerung.

Weiter wird die genannte Aufgabe gelöst von einem Verfahren der eingangs genannten Art, bei welchem ein Träger mit integrierten und von einem Detektor erfaßbaren möglichst engmaschigen Positionsmarkierungen verwendet wird. Dies hat gegenüber den bekannten Verfahren den großen Vorteil, daß eventuelle Ungenauigkeiten des jeweiligen Verfahrensmechanismus nicht mehr zu falschen Untersuchungsergebnissen führen müssen, da die in den Träger integrierten Positionsmarkierungen eine Kontrolle der tatsächlichen Position des Trägers relativ zu einem Detektor erlauben. Besonders vorteilhaft kann dabei als Träger eine im wesentlichen handelsübliche Compact Disc (CD), eine Digital Video Disc (DVD) oder Magneto Optical Disc (MOD) verwendet werden, die bereits über engmaschige interne Positionsmarkierungen verfügen, was eine Positions-

bestimmung auf Mikrometer genau erlaubt, wobei sich die Verfahren zum Lesen und Prüfen der Markierungen auf diesen bekannten Trägern bereits bestens bewährt haben. Aufgrund der Ähnlichkeit von CD, DVD und MOD in Bezug auf die hier benötigten Eigenschaften wird im folgenden der Einfachheit halber nur noch die CD genannt, womit immer auch DVD und MOD eingeschlossen sein sollen.

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendbaren CDs und Auslesegeräte sind im übrigen deutlich preisgünstiger als die bekannten Diagnostik-Chips.

10 Besonders vorteilhaft ist es, bei den oben beschriebenen Verfahren eine lichtdurchlässige Compact Disc zu verwenden. Dies erlaubt es nämlich, ein in an sich bekannter Weise zum Abtasten der Positionsmarkierungen verwendetes Laserlicht gleichzeitig zur Anregung von Lumineszenz-Reaktionen zu benutzen. Alternativ kann eine CD mit einem in die CD integrierten Wellenlängenfilter verwendet werden, wodurch ein Laser mit an sich bekannter Technik für die exakte engmaschige Positionsbestimmung eingesetzt werden kann, dessen Licht nicht auf die auf der anderen Seite der CD aufgebracht oder aufzubringenden Moleküle gelangt. Für die Synthese bzw. für das Auslesen der Lumineszenzreaktion kann dann ein  
15  
20 anderer Laser verwendet werden, dessen Licht den genannten Wellenlängenfilter durchdringen kann. Dieser zweite Laser ist am ersten Laser fixiert, so daß mit der Positionsbestimmung des ersten Lasers automatisch auch die Positionierung des zweiten Laserstrahls auf der CD bekannt ist.

Auch die bei Computern eingesetzten Flachbildschirme besitzen integrierte Positionsmarkierungen derart, daß die einzelnen LED/LCD Bildpunkte ganz genau bestimmten Positionen zugeordnet sind und einzeln ansteuerbar sind, so daß ein in nächster Nähe über den Leuchtdioden/Flüssigkristallen angebrachter durchsichtiger Träger für biologische Materialien an genau definierten Punkten beleuchtet werden kann. Dies gilt umso mehr, wenn die bisher eingesetzten Flüssigkristalle durch einen Array von möglichst dicht gepackten miniaturisierten Lasern oder Leuchtdioden ersetzt werden.

Eine besonders vorteilhafte Lösung gründet dabei auf die Topographie eines Mischarrays von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen mit den darauf aufgetragenen Molekülen mit Leuchtdioden. Die einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden werden dabei in Vertiefungen angeordnet, so daß das von Ihnen abgestrahlte Licht nur bei benachbarten Siliziumerhebungen eine Lumineszenzreaktion anregt. Auch damit ist eine wiederholbare exakte Zuordnung von Anregungslicht und aufgetragenen Molekülen möglich.

Die Verwendung eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden bzw. die Verwendung der genannten Mischarrays bietet die Möglichkeit, den Träger der biologischen Materialien während eines ganzen Zyklus - von der vorzugsweise lithographischen oder durch das Anlegen von einer Spannung vermittelten Synthese der Molekülbibliothek angefangen, über das Färben der Bibliothek mit einer zweiten Molekülbibliothek bis hin zum Auslesen der Bindungsereignisse - über dem Array fixiert zu halten. Dies gewährleistet eine sehr einfache, sehr schnelle und dennoch wiederholt extrem genaue Ansteuerung der einzelnen Bildpunkte, wobei das zeit-

aufwendige Ansteuern und Fokussieren der einzelnen Bildpunkte entfällt. Die Möglichkeit, das Array von Leuchtdioden oder Mikrolasern mit Hilfe eines einfachen Abbildungssystems auf dem Träger in verkleinerter Form abzubilden, erlaubt darüber hinaus eine sehr hohe Packungsdichte der durch lithographische Synthesen aufgetragenen Molekülbibliotheken. Zudem können Träger und Array anschließend getrennt werden, worauf das Array erneut eingesetzt werden kann.

Als Detektoren können z.B. Arrays von Photomultipliern, von PIN-Dioden, von Avalanche-Dioden oder eine sog. Multi Channel Plate verwendet werden. Die Detektoren können auch direkt in die Arrays aus Anregungslichtquellen eingelagert werden, dabei entstehen Mischarrays von Detektoren und Anregungslichtquellen.

Werden die zu untersuchenden Moleküle auf der einen Seite und die Positionsmarkierungen auf der anderen Seite der Compact Disc aufgebracht, so erlaubt es dies, die Anzahl der pro Flächeneinheit auf einem Träger in genau definierter und vor allem wieder auffindbarer Position anordbarer Moleküle gegenüber den bekannten Verfahren enorm zu steigern - konnten bislang etwa  $10^5$  Moleküle so auf einem Träger einer der Größe einer CD vergleichbaren Größe so angeordnet werden, daß ihre Position exakt bestimmbar war, so können jetzt  $10^8$  bis  $10^{10}$  auf einer CD angeordnet, exakt aufgefunden und gezielt untersucht werden. Ähnliches gilt beim Einsatz einer Art Flachbildschirm, insbesondere wenn die bisher gebräuchlichen Flüssigkristalle durch einen Array von Mikrolasern oder von Leuchtdioden ersetzt werden. Die genaue Positionsinformation ergibt sich in diesem Fall

- durch die relative Anordnung der Mikrolaser zueinander, so daß genau definierte Punkte auf einem parallel über dem Flachbildschirm angeordneten vorzugsweise durchsichtigen Träger von Molekülbibliotheken beleuchtet werden können. Damit wird es erstmals möglich, sehr große Molekülbibliotheken auf einem einzigen, sehr handlichen Träger anzuordnen. Z.B. kann auf dem Träger eine vorzugsweise vollständige Peptidbibliothek, insbesondere eine 4-, 5-, 6- oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht sein, wobei der Träger nach dem Aufbringen der Peptidbibliothek z.B. mit einem zu untersuchenden Blutserum in Kontakt gebracht werden kann.
- 5
- 10 Ebenso ist es möglich, auf dem Träger eine vorzugsweise vollständige Oligonukleotidbibliothek, insbesondere eine 15mer Oligonukleotidbibliothek aufzubringen, wobei der Träger nach dem Aufbringen der Oligonukleotidbibliothek z.B. mit zu untersuchender, insbesondere fluoreszenzmarkierter und mit Hilfe von Zufallsoligonukleotidprimern vervielfältigter DNA in
- 15 Kontakt gebracht werden kann. Damit ist es erstmals möglich, in einer einzigen Färbereaktion eine Blutserums- oder DNA-Probe auf sehr viele Infektions-, Autoimmun- bzw. Erbkrankheiten zu testen, wobei der Nachweis eventueller an Molekülen der Peptidbibliothek gebundener Serumantikörper in an sich bekannter Weise durch fluoreszenz-markierte Anti-
- 20 Human-Antikörper erfolgen kann.

- Die Erfindung schafft damit völlig neue diagnostische Möglichkeiten und steigert insbesondere auch die Chancen, diagnostische Marker und Therapeutika zu finden. Werden z.B. vollständige 6mer Peptidbibliotheken mit einer größeren Anzahl von Patientenseren in Verbindung gebracht und z.B.
- 25 mittels einer Färbereaktion daraufhin untersucht, an welchen Peptiden sich

Bestandteile der Seren angelagert haben, so werden sich dabei Korrelationen zwischen Krankheit und gefärbten Peptiden ergeben. Dies liegt daran, daß jeder Mensch in seinem Blutserum ein sehr komplexes individuelles Muster von Antikörperreaktivitäten mit sich trägt, das insbesondere die Auseinandersetzung seines Immunsystems mit akuten, chronischen, verdeckten oder bereits überstandenen Krankheiten widerspiegelt. Ein großer Teil der Antikörperreaktivitäten kann durch die spezifische Bindung an Penta- oder Hexapeptide definiert werden, wodurch bei der Analyse der Bindereaktivitäten an eine vollständige Penta- oder Hexapeptidbibliothek das o.g. individuelle Muster von Antikörperreaktivitäten in bisher nicht gekannter Komplexität bestimmt werden kann. Längere Bindemotive, insbesondere die ebenfalls häufig vorkommenden mit einer helikalen Struktur, können durch Bibliotheken ermittelt werden, in denen nicht jede Aminosäure zufällig ist, sondern nur jene an bestimmten, aus der Struktur abgeleiteten Positionen. Damit können neue diagnostische Marker und bisher unbekannte Korrelationen zwischen Krankheit und spezifischen Antikörperreaktivitäten gefunden werden, darunter z.B. Marker für Tumorerkrankungen, für Herz-Kreislaferkrankungen wie Herzinfarkt, für multiple Sklerose und Parkinson, für alle Arten von Autoimmunkrankheiten und Allergien und für alle Arten von Infektionskrankheiten.

Das entstehende Muster von Markern kann zum einen selbst durch die Korrelation zu bestimmten Krankheitsbildern die diagnostische Aussage ermöglichen. Die neu gefundenen Marker können aber auch gesondert auf Träger aufgebracht und bei künftigen Untersuchungen verwendet werden.



In analoger Weise kann auch versucht werden, Krankheiten zu Bindungsmustern an andere Molekülbibliotheken, wie D-Peptidbibliotheken oder Oligosaccharidbibliotheken, zu korrelieren. Diese Methode ist dabei nicht auf menschliche Krankheiten beschränkt, sondern eignet sich zur Untersuchung forensischer und veterinärmedizinischer Fragestellungen ebenso wie zur Analyse anderer Flüssigkeiten, von Pflanzenextrakten bis hin zu Extrakten aus Mikroorganismen.

Bei einer weiteren Anwendung werden potentiell therapeutisch interessante Moleküle, wie z.B. D-Peptide, die nicht von den menschlichen Verdauungsenzymen abgebaut werden können, auf einem Träger angeordnet und anschließend mit medizinisch relevanten Molekülen, insbesondere mit krankheitserreger-spezifischen Proteinen oder mit Mischungen von krankheitserreger-spezifischen Proteinen in Kontakt gebracht. Dies ermöglicht die gezielte und schnelle Suche nach Bindungspartnern an diese medizinisch relevanten Moleküle. Analog ist auch die Suche nach Enzymliganden, Enzymsubstrat-Analoga oder Enzyminhibitoren möglich.

Anschließend kann dann die Bindung an die medizinisch relevanten Moleküle detektiert werden, z.B. im Wege der Biotinylation oder der Fluoreszenz-Markierung, so daß die D-Peptide oder Aptamere identifiziert werden können, die zumindest Teile des Krankheitserregers binden. Diese D-Peptide oder Aptamere können anschließend nacheinander daraufhin getestet werden, ob sie den Krankheitserreger hemmen. Hat man z.B. ein Enzym des Krankheitserregers (z.B. Protease von HIV, reverse Transcriptase etc.) in geeigneter Menge vorliegen, so kann dieses Enzym

fluoreszenz-markiert werden (entweder direkt oder durch die rekombinante Expression eines kleinen Peptid-tags, das mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers anfärbbar ist). Damit kann festgestellt werden, an welche D-Peptide das Enzym gebunden hat. Anschließend führt man eine weitere Färbereaktion durch, die durch die Enzymaktivität verursacht wird. Beispielsweise präzipitiert die Spaltung durch die HIV-Protease ein fluoreszierendes Peptid, das man nachweisen kann. So erhält man D-Peptide, die das Enzym nicht nur binden, sondern auch gleichzeitig hemmen.

- 5
- 10 Um nachzuweisen, an welchen der auf dem Träger gebundenen Moleküle sich Moleküle angelagert haben, kann das Blutserum oder die DNA nach oder vor dem In-Kontakt-Bringen des Trägers mit dem Blutserum oder der DNA mit einem mit dem Blutserum oder der DNA reagierenden, insbesondere Bindungen eingehenden Stoff in Kontakt gebracht werden. Zweckmäßigerweise wird dabei der mit dem Blutserum oder der DNA reagierende Stoff vor dem In-Kontakt-Bringen mit dem Serum oder der DNA mit einem zur Lumineszenz anregbaren Stoff, insbesondere einem durch Einstrahlung von Laserlicht zur Fluoreszenz anregbaren Farbstoff, eingefärbt. Solche Farbstoffe sind z.B. unter den Namen "Cy3", "Cy5", "FITC" oder
- 20 "TRITC" im Handel erhältlich, wobei vorteilhaft bereits eine ganze Palette von Konjugaten dieser Fluoreszenz-Farbstoffe zur Verfügung steht (z.B. Ziege-Anti-Mensch-Antikörper konjugiertes Cy5).

Wird das zu untersuchende Blutserum mit einem für die Immunglobuline des Typs E spezifischen Nachweisreagenz in Kontakt gebracht, so lassen

sich damit evtl. beim Patienten bestehende Allergien ermitteln, da die Immunglobuline des Typs E für die allergischen Reaktionen wie Asthma oder Heuschnupfen verantwortlich sind. Nicht-Allergiker haben praktisch keine IgEs in ihrem Blutserum, Allergiker unterschiedliche Mengen, die unterschiedliche Allergene erkennen lassen. Schließlich ermöglicht die Erfindung die Suche nach spezifischen Bindungspartnern für ein Zielmolekül aus einer Bibliothek von  $10^8$  bis  $10^{10}$  unterschiedlichen Molekülen und damit - durch die gleichzeitige Identifizierung vieler (unterschiedlich stark bindender) Bindungspartner - nach den für die Bindung des Liganden an das Zielmolekül verantwortlichen Strukturparametern. Dadurch wird der Weg zu Leitstrukturen stark vereinfacht. Beispielsweise können dazu mit den oben genannten Methoden erhaltene Signalmuster automatisch mit Strukturparametern oder Strukturmodellen der identifizierten Liganden aus der benützten Bibliothek korreliert werden.

Um nun eine Peptidbibliothek auf einen Träger, insbesondere auf einen in einem der gerade beschriebenen Verfahren verwendbaren Träger, anzuordnen, kann zunächst eine Oberfläche des Trägers mit einer Kunststoffschicht, die freie Aminogruppen für die Festphasensynthese einer Peptid- oder Oligonukleotidbibliothek enthält (z.B. dem derivatisierten Polystyrol "CovaLink" der Firma Nunc), überzogen werden (zur Einführung von primären Aminogruppen in Polystyrol siehe Fig. 15). Nach dem Einfügen eines geeigneten Spacers werden anschließend die freien Aminogruppen mit einer durch Licht abspaltbaren Schutzgruppe abgeblockt. Ein Beispiel von vielen für eine aktivierte, d.h. mit Aminogruppen reaktive, licht-abspaltbare Schutzgruppe ist Nitroveratryloxycarbonyl (NVOC).

Anschließend werden Schutzgruppen in bestimmten Bereichen des Trägers mittels eines Lasers abgespalten, worauf eine aktivierte Aminosäure, deren eigene Aminogruppe durch eine durch Licht abspaltbare Schutzgruppe blockiert ist, auf den Träger aufgebracht und dort verteilt wird, so daß die Aminosäure an die freien Aminogruppen ankoppeln kann. Danach werden die Verfahrensschritte "Abspalten von Schutzgruppen in bestimmten Bereichen des Trägers" und "Zuführen einer aktivierten Aminosäure, deren eigene Aminogruppe durch die durch Licht abspaltbare Schutzgruppe blockiert ist", für verschiedene, vorzugsweise alle 20 Aminosäuren wiederholt, und schließlich werden die Schutzgruppen von allen synthetisierten Peptiden abgespalten.

Alternativ kann auch eine andere lithographische Methode zum Aufbringen einer Peptidbibliothek angewandt werden. So können z.B. die ausgereiften konventionellen Standardsynthesen (z.B. Gebrauch von fMoc-Schutzgruppen bei der Peptidsynthese) mit einem Einschluß der aktivierten Monomere in photo- oder elektrolabile größere Partikel kombiniert werden. Die eingestrahlten elektromagnetischen Wellen bzw. eine angelegte Spannung spaltet dann nicht die photo- bzw. elektrolabile Schutzgruppe auf dem wachsenden Oligomer ab, sondern setzen die normalen aktivierten Monomere, wie sie für die Standardsynthesen verwendet werden, nur frei. Die aktivierten Monomere werden dabei vorzugsweise bei höherer Temperatur in einem Lösungsmittel gelöst, dessen Schmelzpunkt oder dessen Übergang in einen gel-artigen Zustand nahe bei 20 °C liegt, worauf ein Laserlicht absorbierender Farbstoff beigemischt, das Gemisch abgekühlt und bei tiefer Temperatur zu kleinen festen Partikeln zerrieben wird, die

über dem Träger für die lithographisch synthetisierten Molekülbibliotheken zerstäubt werden. Die aktivierten Monomere werden aus diesen Partikeln lokal nur dort freigesetzt, wo ein Laser die Partikel aufgrund der Absorption des mit eingeschlossenen Farbstoffs erwärmt. Dadurch verflüssigen sich oder gelieren die Partikel und die aktivierten Monomere können in Lösung an die freien Aminogruppen (oder wie bei der Oligonucleotidsynthese an freie Hydroxylgruppen) koppeln. Direkt neben dem erwärmten Ort erstarrt die Flüssigkeit wieder.

Die Erwärmung der festen Partikel findet dabei besonders vorteilhaft mit Hilfe einer wiederholt kurzzeitig einstrahlenden Lichtquelle, insbesondere eines Lasers oder einer Leuchtdiode, statt, wodurch besonders scharf abgegrenzte Übergänge zwischen festen Partikeln und lokal aus den Partikeln freigesetzten Substanzen entstehen.

Alternativ zu schmelzenden Partikeln kann auch ein Cage-Einschluß, insbesondere in Fullerenen, oder eine andere Methode zur Freisetzung verwendet werden, die z.B. durch elektromagnetische Wellen oder eine elektrische Spannung auslösbar ist.

Ferner können alternativ auch ausgewählte Bereiche durch die in schneller Abfolge wiederholte Anlegung einer Spannung erwärmt werden, insbesondere wenn ein Mischarray von einzeln ansteuerbaren Silizium-erhebungen mit Leuchtdioden verwendet werden. Anstelle von aktivierten Monomeren können auch Kombinationen von Monomeren gekoppelt wer-

den, also beispielsweise alle  $20 \times 20$  möglichen aktivierten Dimere von L-Aminosäuren.

5  
Im nächsten Schritt werden die nicht gekoppelten Monomere, die nicht aufgeschlossenen Partikel und/oder die erstarrten Partikel entweder einfach weggeblasen, oder gelöst und gewaschen, erneut feste Partikel, die aktivierte Monomere enthalten aufgebracht, in ausgewählten Bereichen an den Träger gekoppelt und dieser Schritt mit vorzugsweise allen zur Verfügung stehenden unterschiedlichen aktivierten Monomeren nacheinander durchgeführt, anschließend die aufgrund der erfolgten Kopplungen  
10 neu eingeführten Standardschutzgruppen mit bekannten Techniken abgespalten und der nächste Zyklus begonnen bis z.B. eine vollständige Peptidbibliothek synthetisiert wurde. Zusätzliche Modifikationen anderer Art durch andere chemische Reaktionen sind dabei auch möglich, insbesondere biologisch relevante Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen, oder Alkylierungen.

15  
Eine weitere Möglichkeit bei der Verwendung eines Mischarrays von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen mit Leuchtdioden, ist die Steuerung der kombinatorischen Molekülsynthese durch das Anlegen einer Spannung in ausgewählten Bereichen. Dadurch werden entsprechend  
20 geladene aktivierte Monomere für die Molekülsynthese an ausgewählten Bereichen entweder abgestoßen oder angezogen.

Zum Aufbringen einer Oligonukleotidbibliothek auf einen der oben genannten Träger kann analog zur Synthese der Peptidbibliothek vorgegangen

werden, mit dem Unterschied, daß anstelle der 20 verschiedenen aktivierten Aminosäuren nur 4 verschiedene aktivierte Nukleotide verwendet werden müssen. Geeigneterweise werden dafür vier verschiedene 3'-O- phosphoramidite-aktivierte Deoxynucleoside verwendet, die am 5' Ende oder am 3' Ende eine photolabile Schutzgruppe tragen oder die, wie für die Synthese einer Peptidbibliothek beschrieben, in Partikel eingeschlossen über dem Träger zerstäubt und anschließend durch die Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen beweglich gemacht werden. Die für die Oligonukleotidsynthese üblicherweise verwendeten freien Hydroxylgruppen können gleichzeitig mit dem Einfügen eines geeigneten Spacers eingeführt werden.

Analoge Methoden sind auch für die Herstellung von Aptamer-Bibliotheken einsetzbar, d.h. für auf Ribonukleotiden und ihren Derivaten beruhenden Oligomeren. Daneben können auch reaktive Moleküle anderer Art, wie sie z.B. in der kombinatorischen Chemie benutzt werden, in die aktivierbaren Partikel eingeschlossen werden und ortsspezifisch freigesetzt werden. Somit können neben Nukleotiden oder Aminosäuren auch vielfältige andere Gruppen als monomere kombinierbare Bausteine für die Oligomersynthese verwendet werden.

Alternativ kann eine Molekülbibliothek auch durch eines von zahlreichen Druck- oder Spotverfahren auf den Träger aufgebracht werden, wie beispielsweise mittels einer Düse, ähnlich wie sie bei einem Tintenstrahldrucker benutzt wird. Anschließend können ausgewählte Bereiche des Trägers mit Laserlicht oder mit Hilfe von Leuchtdioden derart bestrahlt

werden, daß es in diesen Bereichen zu einer Verankerung der aufgebracht Moleküle auf dem Träger kommt. Dies ist insbesondere deswegen vorteilhaft, weil dadurch später in genau demselben Bereich ein Lumineszenzsignal angeregt und ausgelesen wird, in dem vorher die aufgebracht Moleküle aufgrund der Aktivität des Anregungslasers verankert wurden.

Um dies zu erreichen, kann z. B. vor dem Aufbringen der zu verankernden Molekülen eine bei den jeweiligen Umgebungstemperaturen feste Substanz auf den Träger gebracht werden, welche dann zur Verankerung der Moleküle geschmolzen wird. Dabei kann so vorgegangen werden, daß die Oberfläche eines Trägers (z.B. durch das gleichmäßige chemische Koppeln von Streptavidin oder von Biotin auf dem ganzen Träger) aktiviert wird, dann bei 40 °C gleichmäßig ein bei 10 °C festes (ggf. - wenn hydrophile Moleküle gekoppelt werden sollen - hydrophobes) Farbstoffmolekülen enthaltendes Lösungsmittel auf den Träger aufgebracht wird und man es dort erstarren läßt, worauf dann die an den Träger zu koppelnden Moleküle aufgebracht werden, mittels Laser, Leuchtdioden oder Spannung ausgewählte Bereiche des Trägers erhitzt werden, wodurch sich das Lösungsmittel verflüssigt oder lokal verflüchtigt und das aufgebrachte zu koppelnde Molekül an den Träger binden kann. Die Bindung findet dabei vorzugsweise über Biotin-Streptavidin statt. Anschließend werden ungebundene Moleküle gewaschen und der Zyklus kann mit einem neuen Spot- oder Druckvorgang beginnen, bis schließlich eine dichtgepackte und komplexe Molekülbibliothek auf den Träger aufgebracht ist.



Das Aufbringen oder die Synthese einer Molekülbibliothek auf einen Träger ist jedoch nicht auf die beschriebenen Verfahren beschränkt; als weitere Verfahren seien beispielhaft erwähnt:

- das Spotten von Mikromengen von Molekülen mit Hilfe eines dem Füllfederhalter vergleichbaren Prinzips, insbesondere von PCR-Produkten vervielfältigter Gensequenzen;
- das Spotten von Mikromengen mit Hilfe einer Art Siebdruckverfahren, insbesondere von aktivierten Monomeren für die Oligonukleotidsynthese, die Synthese von Peptiden oder die Synthese von PNAs;
- das Spotten von Mikromengen mit Hilfe einer Art Tintenstrahldrucker, insbesondere von aktivierten Monomeren für die Oligonukleotidsynthese, die Synthese von Peptiden oder die Synthese von PNAs;
- die Synthese von PNAs, wobei an jeder Stelle der Polymerisationszyklen oder nach dem Aufdrucken der Moleküle auch noch andere Verbindungen angehängt oder die bereits gekoppelten Moleküle modifiziert werden können.

Bei einer zur Lösung der eingangs genannten Aufgabe geeigneten Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen, sind

Mittel, insbesondere ein Laser, zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen auf den Träger und ein Detektor zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen der bestrahlten Moleküle vorgesehen, wobei die Mittel, die zum Einstrahlen der Wellen zur Erzeugung kurzzeitiger elektromagnetischer Wellenimpulse ausgebildet sind, derart mit dem Detektor gekoppelt sind, daß der Detektor während des Einstrahlens eines Wellenimpulses eventuell erzeugte Lumineszenz-Reaktionen nicht erfaßt.

Alternativ oder zusätzlich ist es zur Lösung dieser Aufgabe auch möglich, bei einer Vorrichtung der eingangs genannten Art Mittel zur Bewegung des Trägers relativ zum Detektor und zu den Mitteln zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen derart vorzusehen, daß mit elektromagnetischen Wellen bestrahlte Bereiche des Trägers nach dem Einstrahlen der Wellen aus dem Einstrahlungsbereich heraus- und in den Erfassungsbereich des Detektors hineinbewegbar sind, wobei der Träger vorzugsweise drehbar gelagert ist.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform gründet dabei auf die Topographie eines Mischarrays von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen mit den darauf aufgebrachten Molekülen mit Leuchtdioden. Die einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden werden dabei in Vertiefungen angeordnet, so daß das von Ihnen abgestrahlte Licht nur bei benachbarten Siliziumerhebungen eine Lumineszenzreaktion anregt. Damit ist wiederholt detektierbar eine exakte, insbesondere kurzzeitige Anregung ausgewählter Bereiche möglich. Diese Ausführungsform bietet sogar die Möglichkeit, eine durch das Lumineszenzsignal entstandene Spannungsänderung direkt

jeder einzelnen Siliziumerhebung zuzuordnen, so daß in diesem Fall der Träger der Moleküle identisch mit dem Detektor ist.

5 Durch die kurzzeitige Anregung von Fluoreszenzmolekülen kann darüber hinaus auf die gezielte Lumineszenzanregung ausgewählter Bereiche verzichtet werden, wenn die unterschiedlichen Moleküle einer Molekül-  
bibliothek auf ein Array von Detektoren aufgebracht werden. Die Anregung kann in diesem Fall vorzugsweise durch einen gepulsten Laser erfolgen, dessen Licht eine größere Zahl von Detektoren erfaßt. Der in den  
10 Dunkelphasen der Anregung aufgrund der Lumineszenz der Moleküle entstehende Strom kann dann parallel in den einzelnen Photodetektoren ausgelesen werden und damit den einzelnen Mitgliedern der Molekül-  
bibliothek zugeordnet werden.

15 Die räumliche Entkopplung von Anregung und Detektion kann des weiteren im Falle der Anregung durch ein Array von Mikrolasern oder Leuchtdioden sehr einfach durch ein relativ grobes Raster von Detektoren erfolgen, die die in alle Raumrichtungen gestreute Lumineszenz der von dem Anregungslaser angeregten Moleküle erfassen. Dazu muß nur der eine Detektor, der das von dem Anregungslaser eingestrahlte Licht erfaßt, ausgeblendet werden. Natürlich kann die zeitliche Entkopplung von Anregung  
20 und Detektion auch mit der räumlichen Entkoppelung kombiniert werden.

Bei einer anderen Ausführungsform einer Vorrichtung zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, mit Mitteln

zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen auf den Träger und einem Detektor zur Beobachtung der bestrahlten Moleküle sind Mittel zum Ablösen ausgewählter Moleküle vorgesehen, was es insbesondere dann vorteilhaft ermöglicht, Moleküle gezielt von dem Träger abzulösen, wenn diese bei einem ersten Analyseschritt aufgefallen sind. Die abgelösten Moleküle können anschließend einer weiteren Untersuchung, insbesondere einem Detektor zweiter Art, z.B. einem Spektrometer, insbesondere einem Massenspektrometer, zugeleitet werden, mit dem bestimmte Eigenschaften der abgelösten Moleküle erfaßbar sind.

10 Die Mittel zum Ablösen können in vorteilhafter Weiterbildung der genannten Vorrichtung einen Laser umfassen. Besonders einfach und vorteilhaft ist für diesen Zweck jedoch die Verwendung eines elektrisch ansteuerbaren und aufladbaren Trägers, wobei die an den Träger gebundenen Moleküle in ausgewählten Bereichen sehr einfach durch das Anlegen einer Spannung abgelöst werden können.

Als Träger für Moleküle, insbesondere biologische Moleküle, insbesondere zur Verwendung in einem der genannten Verfahren können erfindungsgemäß Träger Verwendung finden, die ein engmaschiges Netz von integrierten Positionsmarkierungen aufweisen, so daß es möglich wird, die Position einer z.B. mittels einer üblichen Mechanik mit einem Detektor auf dem Träger angefahrenen zu untersuchenden Stelle zu kontrollieren. Bevorzugt sind dabei die Positionsmarkierungen so ausgebildet, daß sie von einem optoelektronischen Abtastsystem erfaßbar sind.

Wird als Träger eine im wesentlichen handelsübliche Compact Disc verwendet, so hat dies neben Kostenvorteilen gegenüber den bekannten Diagnostik-Chips den Vorteil, daß zur Untersuchung des Trägers auf im wesentlichen handelsübliche Geräte, insbesondere die in CD-Spielern und CD-Brennern vorgesehen Lese- und Schreiblaser zurückgegriffen werden kann. Wird dann noch die Compact Disc lichtdurchlässig ausgebildet, so kann das Licht des Lasers nicht nur zur optoelektronischen Positionserfassung, sondern gleichzeitig auch zur Anregung von Lumineszenz-Reaktionen von auf der CD gebundenen Molekülen verwendet werden. Alternativ können CDs oder analoge Medien mit einem in die CD integrierten Wellenlängenfilter verwendet werden, wobei ein Laser, dessen Licht den Wellenlängenfilter nicht durchdringen kann, für die ortsgenaue Positionierung der CD verwendet wird, während ein zweiter Laser, dessen Licht den Wellenlängenfilter durchdringen kann, aufgrund seines zu dem ersten Laser fixierten Abstandes zur wiederholten ortsgenaue Synthese oder Anregung einer Lumineszenzreaktion verwendet werden kann.

Ähnliche Vorteile werden durch die Verwendung eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden zur Anregung der Lumineszenz-Reaktion erzielt. Die genaue Positionsinformation ergibt sich in diesem Fall durch die relative Anordnung der Mikrolaser zueinander, so daß nahezu beliebig oft wiederholbar genau definierte Punkte auf einem parallel über dem Array angeordneten vorzugsweise durchsichtigen Träger von Molekülbibliotheken beleuchtet werden können. Der Träger kann dabei aus nahezu beliebigen Materialien bestehen, insbesondere aus für die Synthese einer Molekülbibliothek derivatisiertem Glas.

Insbesondere bei der lithographischen Synthese einer Molekülbibliothek kann bei der Verwendung eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden der Träger der Molekülbibliothek besonders vorteilhaft über dem Array fixiert werden. Zusätzlich kann daran auch noch ein Array von Detektoren  
5 fixiert werden, was insbesondere eine Kalibrierung der erzielten Einzelsignale mit einem gleichmäßig fluoreszenzmarkierten Träger ermöglicht.

Das gleiche gilt für den weiter oben beschriebenen Mischarray von einzelnen ansteuerbaren Siliziumerhebungen (mit den darauf aufgebrachtten Molekülen) mit Leuchtdioden. Auch solche Mischarrays können an einem Detektor  
10 oder einem Array von Detektoren fixiert werden, wenn nicht sogar die durch ein Lumineszenzsignal entstandene Spannungsänderung direkt jeder einzelnen Siliziumerhebung zugeordnet wird, so daß in diesem Fall der Träger der Moleküle identisch mit dem Detektor ist. Dies gewährleistet eine sehr einfache und dennoch extrem genaue, wiederholbare Ansteuerung  
15 der einzelnen Bildpunkte während der lithographischen oder durch das Anlegen einer Spannung gesteuerten Synthese der Molekülbibliothek und den sich daran anschließenden Färbe- und Ausleseschritten, darüber hinaus entfällt das zeitaufwendige Ansteuern und Fokussieren der einzelnen Bildpunkte. Aufgrund des Fehlens jeglicher bewegter Teile ist eine solche  
20 Ausführungsform besonders robust und einfach in der Handhabung.

Auf einem solchen Träger können hochkomplexe Molekülbibliotheken, z.B. eine Peptidbibliothek, insbesondere eine vorzugsweise vollständige 4-, 5-, 6- oder 7mer Peptidbibliothek, oder eine Oligonukleotidbibliothek, insbesondere eine vorzugsweise vollständige 12-, 13-, 14- oder 15mer Oligonuk-

leotidbibliothek oder Aptamerbibliothek, so aufgebracht werden, daß die Position der einzelnen Moleküle bzw. Molekülgruppen aus mehreren Molekülen einer Molekülart wiederholt exakt anfahrbar und damit gezielt untersuchbar ist.

5 Zum Aufbringen von Molekülen auf eine im wesentlichen ebene Oberfläche eines Trägers wird erfindungsgemäß zum einen eine Vorrichtung vorgeschlagen, die Mittel zur drehbaren Halterung des Trägers um eine zu der genannten Oberfläche des Trägers im wesentlichen senkrechte Drehachse, Mittel zum Aufbringen verschiedener Flüssigkeiten auf die Oberfläche des  
10 Trägers im Bereich der Drehachse und wenigstens einen relativ zum Träger verfahrbaren Laser zum Bestrahlen ausgewählter Bereiche des Trägers mit Laserlicht umfaßt.

15 Bei der Verwendung eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden wird in den Lichtstrahl der Lichtquellen ein geeigneter vorzugsweise durchsichtiger Träger gebracht und dort fixiert. Die genaue Positionsinformation ergibt sich in diesem Fall durch die relative Anordnung der Mikrolaser bzw. Leuchtdioden zueinander, so daß genau definierte Punkte auf dem Träger wiederholt beleuchtet werden können. Dies kann insbesondere für die lithographische Synthese und das anschließende Auslesen von Molekül-  
20 bibliotheken ausgenützt werden.

Wenn die Molekülbibliotheken unabhängig von der Aktivität des bzw. der Anregungslaser auf den Träger aufgebracht werden, so dienen in Bezug zu der aufgebrachten Molekülbibliothek regelmäßig angeordnete, in geeigne-


ter Weise detektierbare "guide dots" als Bezugspunkt zur Positionsbestimmung der aufgetragenen unterschiedlichen Moleküle.


Alternativ kann dazu auch eine Vorrichtung dienen, bei der düsenartige Mittel zum Aufbringen kleinster Mengen auf dem Träger zu verankernden Moleküle, Mittel zum Verfahren der Mittel zum Aufbringen der Moleküle und des Trägers relativ zueinander und wenigstens ein Laser zur Bestrahlung ausgewählter Bereiche des Trägers mit Laserlicht vorgesehen sind.


Alternativ können Moleküle oder Molekülbibliotheken auch mit verschiedenen bereits bekannten Druckverfahren auf den verwendeten Träger aufgebracht werden, z.B. mit einem modifizierten Siebdruckverfahren. PCR-Fragmente werden beispielsweise momentan nach dem Prinzip des Füllfederhalters aufgedruckt. Letzteres erlaubt zwar die Synthese hochkomplexer Molekülbibliotheken, jedoch müssen bei Druckverfahren die einzelnen Spots an den Auslesemechanismus angepaßt werden, was sehr zeitaufwendig ist, da jeder Spot angefahren und in der Regel durchfokussiert werden muß, bis schließlich die Einstellung gewählt wird, die die maximale Lichtausbeute gibt, was sich bei Verwendung einer CD oder eines Arrays von Mikrolasern oder Leuchtdioden erübrigt, da insbesondere bei einem Array von Mikrolasern die einzelnen Bildpunkte mit nahezu parallelem Licht durchstrahlt werden. Gleiches gilt, wenn ein Array von Detektoren als Träger der Moleküle verwendet wird.



Auch bei einer CD oder analogen Trägern ist das genannte Problem aufgrund des extrem engmaschigen Netzes von Positionsinformationen sehr gemildert, da sich immer in nächster Nähe ein Pit findet, relativ zu dem die Moleküle auf dem Träger verankert und ausgelesen werden können.

5  
 Insbesondere wenn als Träger der Moleküle ein weiter oben beschriebener Array von einzeln ansteuerbaren Siliziumerhebungen oder ein Mischarray mit Leuchtdioden verwendet wird, können aufgedruckte Moleküle auch aufgrund einer in ausgewählten Bereichen angelegten Spannung auf den Träger aufgebracht werden, wenn die aufzubringenden Moleküle eine entsprechende Ladung tragen oder mit Hilfe der gezielt ansteuerbaren Lichtquellen in ausgewählten Bereichen ionisiert wurden.

10  
 Die Erfindung erlaubt es dem Fachmann also vorteilhaft, die zur Aufbringung der jeweiligen Moleküle auf die jeweiligen Träger optimal geeignete Vorrichtung zu wählen, wobei er im Einzelfall auch beide Vorrichtungen kombinieren und zunächst einen Teil der Moleküle mit der einen und dann einen anderen Teil der Moleküle mit der anderen Vorrichtung auf den Träger aufbringen kann.

15  
 Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der rein beispielhaften und nicht beschränkenden Beschreibung einiger Ausführungs- bzw. Durchführungsbeispiele in Verbindung mit der Zeichnung.

20 In Fig. 1 ist das Funktionsprinzip einer Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf der Oberseite 10 eines Trägers 12 gebun-

denen biologischen Molekülen 14 veranschaulicht, wobei der Träger 12 um eine zur Oberseite 10 senkrechte Achse 16 rotiert, wie durch den Pfeil 18 angedeutet. Dabei handelt es sich bei dem Träger 12 um eine im wesentlichen handelsübliche CD, die jedoch lichtdurchlässig ausgebildet ist und die auf ihrer der Oberseite 10 gegenüberliegenden Seite mit Vertiefungen, sog. "Pits" versehen ist, die durch die Striche 20 angedeutet sind und die sich unter einer transparenten Schutzschicht befinden.

Die Pits bilden interne Positionsmarkierungen, die von dem hier nur angedeuteten optoelektronischen Erfassungssystem eines üblichen CD-Spielers oder CD-Brenners gelesen werden können. Das Erfassungssystem besteht dabei bekannterweise im wesentlichen aus einem hier nicht gezeigten Laser und einer - wie durch den Bewegungspfeil 22 angedeutet - verstell- oder verfahrbaren Fokussierspule oder -linse 24, welche es erlaubt, die von dem Laser erzeugten Strahlen 26 vorteilhaft sowohl zum Abtasten der Pits 20 und damit zur Positionsbestimmung als auch - wie in dem in der Figur gezeigten Zeitpunkt - durch die CD hindurch zur Bestrahlung und eventuellen Anregung der Moleküle 14 zu verwenden.

Dem Ort der Bestrahlung ist in Bewegungsrichtung der CD ein lichtempfindlicher Detektor 28 nachgeordnet, dem eine Linse 30 zugeordnet ist, die von eventuell angeregten Molekülen emittierte Lichtstrahlen 32 bündelt und auf den Detektor 28 lenkt. Durch diese Anordnung ist sichergestellt, daß das Licht des Lasers nicht den Detektionsvorgang durch Überlagerung stört. Zudem können so Lumineszenz-Reaktionen angeregter Moleküle erfaßt werden, während gleichzeitig bereits neue Moleküle bestrahlt werden,

so daß die Untersuchung der auf der CD angeordneten Moleküle vorteilhaft mit sehr hoher Geschwindigkeit durchgeführt werden kann.

In Fig. 2 ist die Verwendung eines Arrays 40 von Mikrolasern 42, 44 zur Anregung von auf einer Flachseite 46 eines Trägers 48 gebundenen Molekülen 50, 52 dargestellt. Da die Mikrolaser einzeln ansteuerbar und relativ zueinander in festgelegter Position angeordnet sind, können genau definierte Punkte auf dem parallel über dem Array 40 befestigten im gezeigten Beispiel durchsichtigen Träger 48 beleuchtet und dort befindliche Moleküle ggf. zur Lumineszenz angeregt werden. So sind zum dargestellten Zeitpunkt die Mikrolaser 42 inaktiv, während der Mikrolaser 44 aktiv ist und Licht auf die Molekülgruppe 50 einstrahlt. Es sei an dieser Stelle betont, daß der Träger 48 zwar bei diesem Ausführungsbeispiel durchsichtig ist, daß der Träger aber nicht notwendigerweise durchsichtig sein muß, denn anregende Lichtquelle und Detektor können auch auf ein und derselben Seite des Trägers angeordnet werden, nämlich auf der Seite, auf der sich die zu untersuchenden Moleküle befinden.

Zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen ist bei diesem Ausführungsbeispiel ein Array 54 aus einer Anzahl von Detektoren 56, 58 vorgesehen. Dies erlaubt eine besonders einfache Trennung von Anregung und Detektion dadurch, daß der oder die im direkten Strahlenbereich eines aktiven, also eine Anregung der Moleküle bewirkenden Lasers 44 befindlichen Detektoren 58 zumindest während des Emittierens des Lasers "ausgeschaltet" werden, z.B. in der Weise, daß evtl. auf den Detektor oder die Detektoren einfallende Strahlung nicht weiter erfaßt oder Signale von den

jeweiligen Detektoren nicht weitergeleitet oder ausgewertet werden. Die anderen Detektoren 56 können, vorzugsweise bei gepulster Einstrahlung, ebenfalls für die Dauer der Anregungsphase ausgeschaltet werden, was aber nicht zwingend notwendig ist. Insbesondere ist es möglich, zwischen dem Array 54 von Detektoren und dem Träger 48 einen Wellenlängenfilter 60 anzuordnen, der Strahlung 62 mit der Wellenlänge der Anregungslaser ausfiltert oder zumindest stark abschwächt (wie durch die Strahlen 62' angedeutet), Lumineszenz-Strahlung 64 dagegen passieren läßt, so daß diese von den aktiven Detektoren 56 erfaßt und in entsprechende Signale umgewandelt werden kann, welche dann an eine an sich bekannte und daher hier nicht weiter beschriebene Signalauswertungseinrichtung, z.B. einen Computer, weitergeleitet werden können.

Ein in Fig. 2 gezeigter Träger kann z.B. dann, wenn für die Synthese und das Auslesen einer hochkomplexen Molekülbibliothek eine sehr genaue Auflösung der einzelnen Bildpunkte auf dem Träger benötigt wird, bereits vor einer z.B. lithographischen Synthese einer Molekülbibliothek fest (aber nicht unlösbar) mit dem Array von Mikrolasern verbunden werden und dies während der Synthese und Färbung mit einer zweiten Substanz (beispielsweise dem Blutserum von Patienten) bis zum Auslesen der Lumineszenz-Reaktion auch bleiben. Anschließend kann der Träger entsorgt und ein neuer Träger fest mit dem Array von Mikrolasern verbunden werden. Zusätzlich kann auch ein Array von Detektoren fest mit dem Array von Mikrolasern verbunden werden, wie in Fig. 10 dargestellt.

Alternativ können auf dem Träger sogenannte "guide dots" in regelmäßigen Abständen eingefügt werden, die jeweils ein definiertes Lumineszenz-Signal ergeben und damit die Funktion der Pits auf der CD übernehmen, d.h. ein internes Raster abgeben, das zur Positionsinformation dient.

5 Das Entkoppeln von Anregung und Detektion ist bei diesen Beispielen noch einfacher als bei dem Beispiel mit Verwendung einer CD als Träger, da ein Mikrolaser nach dem anderen aktiviert werden kann. Beispielsweise kann man ein größeres Raster von Photodioden über dem Array aufbauen, wobei jeweils die Diode im Intensitätsmaximum des gerade aktiven Anregungs-  
10 lasers ausgeschaltet ist.

Ist die Leistung des bzw. der Laser steuerbar, so kann/können der/die Laser auch zum Ablösen ausgewählter Moleküle von dem Träger verwendet werden, wobei die abgelösten Moleküle dann in geeigneter Weise einer weiteren Untersuchungseinrichtung, z.B. einem Massenspektrometer, zugeführt werden können.  
15

In der Fig. 8 ist noch einmal beispielhaft das Grundprinzip des vorgestellten Untersuchungsverfahrens dargestellt: ausgewählte Bereiche 7 eines Trägers 12 mit daran gekoppelten Molekülen oder Aggregaten 4 an diese Moleküle oder mit Molekülen 8, die mit den gekoppelten Molekülen 2 oder  
20 mit den Aggregaten an diese Moleküle 4 in Wechselwirkung treten, werden mit elektromagnetischen Wellen 6 bestrahlt.

In den Fig. 9 und 10 ist schematisch gezeigt, wie die physikalische Umgebung, insbesondere die Matrixschicht 3 von Substanzen 5 in lokal eng begrenzten Bereichen 7 durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen 13 (Fig. 9) oder durch das Anlegen einer Spannung 13' (Fig. 10) verändert werden kann, so daß die vorher immobilisierten Substanzen 9 beweglich gemacht werden (bewegliche Substanzen sind durch 11 angedeutet) und in die Nähe des Trägers 12 gelangen können. Dort können sie an auf dem Träger befindliche Moleküle 2 ankoppeln (Bindungen eingehen), ein Aggregat bilden oder Teil einer sonstigen chemischen Reaktion werden. In Fig. 10 ist zudem gezeigt, daß der Träger 12 in ein Mischarray 17 aus Detektoren 56 und aus gezielt ansteuerbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, z.B. Leuchtdioden 19, eingebettet sein kann. Ausgewählte Bereiche 7 des Trägers 12 werden dabei zweckmäßigerweise durch einen nicht-leitenden und auch für die eingestrahlten elektromagnetischen Wellen undurchlässigen Isolator 21 voneinander getrennt.

Wie in Fig. 11 veranschaulicht, können mit einem Array von einzeln ansteuerbaren Mikrolasern ausgewählte Bereiche eines über dem Array fixierten Trägers wiederholt punktgenau bestrahlt werden. Dadurch können Moleküle einer Molekülbibliothek mit lithographischen Methoden auf ausgewählte Bereiche des Trägers aufgebracht werden. Nach der Einfärbung der Molekülbibliothek mit einem Fluoreszenzfarbstoff werden die fluoreszierenden Moleküle in nacheinander ausgewählten Bereichen mit einem kurzzeitigen Lichtimpuls angeregt. Die zwischen den Anregungsimpulsen durch die Fluoreszenz der Moleküle erzeugte Strahlung wird von den Photodetektoren aufgefangen und kann einzelnen Mitgliedern der

Molekülbibliothek zugeordnet werden, so daß genau ermittelt werden kann, bei welchen Molekülen Fluoreszenzreaktion hervorgerufen wurden.

Bei einem entsprechend ausgebildeten Mischarray 17 aus einzeln ansteuerbaren Lichtquellen 19 und Detektoren 56 können - wie in Fig. 12 gezeigt - die Detektoren 56 selbst Träger 12 von unterschiedlichen Molekülen 2, 4 und 8 sein. Ein solches Mischarray 17 kann z.B. dazu verwendet werden, in ausgewählten Bereichen 7 eine kombinatorische Molekülsynthese auszulösen, ausgewählte Bereiche 7 kurzzeitig mit elektromagnetischen Wellen 6 anzuregen und die bei einer solchen Anregung eventuell entstehenden Lumineszenzreaktionen direkt zu messen. Als Detektoren 56 können dabei insbesondere Siliziumträger, Leuchtdioden oder ein davon unabhängiger Array aus Detektoren verwendet werden. Zur Trennung der Bereiche 7 voneinander ist ein nichtleitender, für die eingestrahltten elektromagnetischen Wellen undurchlässiger Isolator 21 vorgesehen.

In den Fig. 13 und 14 ist schematisch gezeigt, wie ein Array 23 aus einzeln ansteuerbaren Detektoren 27 (Fig. 13), die Träger 12 von unterschiedlichen Molekülen 2,4 und 8 sein können, bzw. ein Array aus einzeln ansteuerbaren Leuchtdioden 29 (Fig. 14), die auch als Photodetektoren verwendet werden können, dazu verwendet werden kann, in ausgewählten Bereichen 7 eine kombinatorische Molekülsynthese auszulösen, größere Bereiche 25 oder ausgewählte Bereiche 7 kurzzeitig mit elektromagnetischen Wellen 6 anzuregen und die bei einer solchen Anregung eventuell entstehenden Lumineszenzreaktionen in den Dunkelphasen der Anregung direkt zu messen. Als Detektoren 27 können dabei

insbesondere Siliziumträger verwendet werden (Fig. 13). Zur Trennung der Bereiche 7 voneinander ist wiederum ein nichtleitender, für die eingestrahelten elektromagnetischen Wellen undurchlässiger Isolator 21 vorgesehen.

Nachfolgend sind einige Beispiele der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren bzw. der Anwendung erfindungsgemäßer Vorrichtungen beschrieben:

- a) Synthese einer vollständigen 6mer Peptidbibliothek auf einer CD unter wasserfreien Bedingungen

Die Oberfläche einer CD wird mit einer Kunststoffschicht überzogen, die freie Aminogruppen für die Festphasensynthese enthält. Nach der Kopplung eines geeigneten Spacers von 2-3 Aminosäuren Länge mit Hilfe von Standard fMoc-Peptidsynthese, werden freie Aminosäuren anschließend mit einer durch Licht abspaltbaren Schutzgruppe abgeblockt. Die Zuleitung der zu koppelnden Schutzgruppe erfolgt durch einen Schlauch auf das Innere der sich drehenden CD. Dabei kann ein leicht modifiziertes Syntheseprogramm eines an sich bekannten Peptidsynthesizers verwendet werden. Ein Programm, das die Aktivität eines Brennlasers steuert, spaltet die Schutzgruppen an den Bereichen ab, wo im ersten Schritt die Aminosäure Alanin gekoppelt werden soll. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt durch Zwei-Photonen-Aktivierung mit Hilfe des Brennlasers und eines von oben einstrahlenden, etwas weniger fokussierten zweiten Lasers. Nach der selektiven Abspaltung der Schutzgruppe wird die aktivierte Aminosäure



Alanin durch den oben erwähnten Schlauch der CD zugeführt. Die aktivierte Aminosäure koppelt an die freien Aminogruppen, wobei die eigene Aminogruppe der Aminosäure zuvor durch die gleiche Schutzgruppe wie oben erwähnt blockiert worden ist. Dieser Vorgang wird für die anderen 19 Aminosäuren wiederholt und das Ganze insgesamt sechs Mal wiederholt. Im letzten Schritt werden die Schutzgruppen von allen synthetisierten Peptiden abgespalten.

b) Synthese einer vollständigen 5mer Peptidbibliothek mit Hilfe eines Arrays von Mikrolasern

Ein geeigneter flacher, durchsichtiger Träger, der freie Aminogruppen enthält wird fest über dem Array von Mikrolasern fixiert. Geeignet sind dabei insbesondere dünne Glasscheiben, die mit konz. NaOH gereinigt, anschließend mit Wasser gewaschen und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 10% (vol/vol) bis(2-hydroxyethyl) aminopropyltriethoxysilan derivatisiert wurden. Alternativ kann ein geeigneter flacher, durchsichtiger Träger mit einer Kunststoffschicht überzogen werden, die freie Aminogruppen für die Festphasensynthese enthält.

An die freien Aminogruppen wird mithilfe von dem Fachmann geläufiger Standard fMoc-Peptidsynthese unter wasserfreien Bedingungen zunächst ein geeigneter Spacer von 2-3 Aminosäuren Länge synthetisiert.

Anschließend wird der Träger parallel zur X-Achse in 20 voneinander getrennte Bereiche unterteilt, die von den 20 verschiedenen jeweils in DMF gelösten aktivierten fMoc-Derivaten der Aminosäuren benetzt werden.

5 Die Kopplung der aktivierten Aminosäuren findet anschließend bei Raumtemperatur für 30-60 Minuten statt. Nach 3 maligem Waschen mit Dimethylformamid (DMF) wird die fMoc-Schutzgruppe mithilfe von 20% Piperidin in DMF abgespalten und erneut mit DMF gewaschen.

10 Der Träger wird erneut in 20 voneinander getrennte Bereiche unterteilt, diesmal parallel zur Y-Achse. Diese Bereiche werden wiederum von den 20 verschiedenen jeweils in DMF gelösten aktivierten fMoc-Derivaten der Aminosäuren benetzt gefolgt von der oben beschriebenen dem Fachmann geläufigen Standard fMoc-Peptidsynthese.

15 Nach der wie oben beschriebenen Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe ist in diesem Stadium der oben beschriebene Träger in 400 voneinander abgegrenzte Bereiche unterteilt, mit jeweils einem von 400 möglichen C-terminal durch einen Spacer an den Träger gekoppelten Dipeptiden deren N-Terminus frei, d.h. ohne Schutzgruppe vorliegt.

20 Für die nächsten Kopplungsschritte werden die oben beschriebenen aktivierten Aminosäuren einzeln statt in DMF in einem geeigneten bei 50 °C flüssigen, bei 4 °C festen Lösungsmittel gelöst, ein geeigneter das Laserlicht absorbierender und in Bezug auf die aktivierten Aminosäuren

inertem Zusatzstoff, insbesondere ein Farbstoff oder Graphitpartikel, zugegeben, die Lösung tiefgefroren und in kleine Partikel zerrieben.

5 Diese Partikel werden bei 4 - 10 °C auf den über einem Array von Mikrolasern fest montierten Träger gestäubt, eine Abdeckplatte darübergelegt und ausgewählte Bereiche für 20-30 Minuten mit den Mikrolasern bestrahlt. Die Absorption des Laserlichts durch den beigemengten Farbstoff erwärmt dabei lokal in den bestrahlten Bereichen das bei den gewählten Temperaturen gefrorene Lösungsmittel und ermöglicht damit die Kopplung der aktivierten Aminosäuren an die freien Aminogruppen ausschließlich in diesen Bereichen. 10 Anschließend wird die Abdeckplatte entfernt, und die nicht gekoppelten Aminosäuren werden mit DMF gewaschen, wobei dieser Waschvorgang mit erwärmtem DMF 2x wiederholt wird.

15 Dieser Vorgang wird insgesamt 20x mit allen aktivierten Aminosäuren wiederholt, sodaß die oben beschriebenen 400 voneinander abgegrenzten Bereiche in 20 x 400 definierte Bereiche unterteilt werden, gefolgt von der oben beschriebenen Abspaltung der fMoc-Schutzgruppen mit 20% Piperidin in DMF.

20 Die Verlängerung der Peptide um eine 4. und 5. Aminosäure erfolgt anschließend analog zur Synthese der 3. Aminosäure, wobei wie oben beschrieben bei jedem Syntheseschritt jeder Bereich in 20 Bereiche unterteilt wird.

Schließlich werden alle Schutzgruppen mit 10% Silan in konzentrierter Trifluoressigsäure abgespalten, der Träger mit DMF und Methanol gewaschen und getrocknet, sodaß im Endeffekt ein Träger mit  $20^5 = 3.200.000$  verschiedenen Bereichen entsteht, die jeweils eines von allen möglichen C-terminal gekoppelten Pentapeptiden repräsentieren.

- c) Untersuchung von Blutserum unter Verwendung einer Compact Disc mit einer darauf fixierten Peptidbibliothek

Die CD wird mit dem Blutserum eines Patienten gefärbt, wozu zunächst unspezifische Bindungen mit einer geeigneten wäßrigen Lösung, wie zum Beispiel 2 % Milchpulver in PBS abgeblockt werden und das Blutserum im gleichen Puffer verdünnt wird, worauf dann die Oberfläche der CD unter leichtem Schütteln für 60 Minuten mit dem Serum benetzt wird. Die CD wird drei Mal gewaschen. Der an den Farbstoff Cy5 gekoppelte Ziegen-Anti-Mensch-Antikörper wird in 2 % Milchpulver in PBS verdünnt; anschließend wird damit die Oberfläche der CD unter leichtem Schütteln für 60 Minuten benetzt und sodann drei Mal gewaschen. Die mit dem zweiten Antikörper gefärbte Compact Disc wird in einem abgewandelten CD-Spieler ausgelesen.

- d) Auslesen einer gefärbten Compact Disc mittels eines umgebauten CD-Brenners

Ein auf schwache Wattstärke eingestellter Brennlaser rastert die CD im ersten Durchlauf ab. Dabei werden eventuelle Fluoreszenzsignale mit Hilfe der in den CD-Brenner zusätzlich eingebauten Optik detektiert und den einzelnen CD-Bereichen zugeordnet. Diese zusätzliche Optik besteht aus einer fokussierenden Linse, die einen oder, wenn gewünscht, mehrere Pits auf einen Photomultiplier oder eine CCD-Kamera abbildet. Die Linse bildet dabei einen Punkt in Laufrichtung der CD außerhalb des Maximums des einstrahlenden Lasers ab. Zusätzlich wird das Laserstreulicht durch einen geeigneten Kantenfilter von dem Fluoreszenzsignal abgetrennt. Die Bereiche der CD, die im ersten Durchlauf ein Signal ergaben, werden in den folgenden Durchgängen gezielt angesteuert und mehrfach abgerastert. Die dabei abgelesenen Signale werden aufaddiert und den positiven Pits zugeordnet.

e) Untersuchung von Blutserum unter Verwendung eines Trägers mit darauf fixierter Peptidbibliothek

Wie bei Beispiel c) beschrieben wird der in diesem Beispiel fest auf einem Array von Mikrolasern montierte Träger mit einer in Beispiel b) beschriebenen lithographisch synthetisierten vollständigen Pentapeptid-Bibliothek mit einer geeigneten wässrigen Lösung, vorzugsweise 2% Milchpulver in PBS, abgeblockt, mit dem verdünnten Blutserum von Patienten inkubiert und anschließend mit einem Cy5 gekoppelten Ziege-anti-Mensch-Antikörper gefärbt.

Anschließend wird sequentiell jeweils ein Mikrolaser nach dem anderen angeschaltet und das von evtl. gebundenen Fluoreszenzmolekülen emittierte Licht mithilfe eines gröberen Rasters von Photodioden über dem Array von Mikrolasern ausgelesen, wobei jeweils die Diode im Intensitätsmaximum des gerade aktiven Anregungslasers ausgeschaltet ist (vgl. Fig.: 2). Das von dem Anregungslaser verursachte Streulicht wird zusätzlich durch einen geeigneten Wellenlängenfilter von dem Fluoreszenzlicht abgetrennt.

Um das Signal / Rausch Verhältnis noch weiter zu verbessern, kann der einstrahlende Mikrolaser gepulst werden, wobei die Detektion des Fluoreszenzsignals in den Dunkelphasen des einstrahlenden Lasers erfolgt.

Die Fluoreszenzsignale werden in insgesamt 10 unterschiedliche Helligkeitsstufen unterteilt, die den einzelnen Mikrolasern (d.h. in diesem Fall den unterschiedlichen Pentapeptiden) zugeordnet werden.

Die Mikrolaser, die in einem ersten Durchlauf die höchsten Fluoreszenzsignale ergaben können anschließend mehrfach hintereinander zur Anregung verwendet werden, wonach die dabei erhaltenen Fluoreszenzsignale gemittelt werden.

- f) Synthese einer vollständigen 12mer Oligonukleotidbibliothek auf einem Träger mit Hilfe eines Arrays von Mikrolasern

Wie in Beispiel b) für die Synthese einer vollständigen 5mer Peptidbibliothek beschrieben, wird ein geeigneter flacher durchsichtiger Träger mit freien Aminogruppen verwendet.

5 Falls nicht schon durch den ersten Schritt vorhanden, wird an die freien Aminogruppen mithilfe von dem Fachmann geläufiger Standardynthese unter wasserfreien Bedingungen ein geeigneter Linker synthetisiert, der wiederum freie Aminogruppen auf dem Träger verankert, die diesmal jedoch ca 22 Atome von der Oberfläche entfernt sind.

10 Anschließend wird der Träger parallel zur X-Achse in 4 voneinander getrennte Bereiche unterteilt, die von 4 verschiedenen aktivierten Nucleosidhydraten mit Schutzgruppen benetzt werden. Die Nucleoside koppeln anschließend an die freien Aminogruppen (Fig. 3). Anstelle des im basischen abspaltbaren Linkers kann auch ein unter diesen Bedingungen stabiler Linker verwendet werden.

15 Die Kopplung der aktivierten Nucleoside (mit Schutzgruppen) an den festen Träger, das Abspalten der Schutzgruppen und die Waschschrte finden unter den dem Fachmann bekannten Standardbedingungen für die Oligonukleotidsynthese statt. Beispiele für die dabei verwendeten Schutzgruppen sind:

- 20
- DMTr für das 5'-Ende der Nucleoside (Fig. 3)
  - Benzoyl im Falle der Basen Adenin und Cytosin (Fig. 4)
  - Isobutyryl im Falle der Base Guanin (Fig. 4)

- Methoxy - oder Beta-cyanoethyl - im Falle der Phosphatgruppen (Fig. 4)

5 Nach der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe von dem 5'-Ende der Nucleoside wird im nächsten Schritt der Träger erneut in 4 voneinander getrennte Bereiche unterteilt, die diesmal parallel zur Y-Achse verlaufen. Diese Bereiche werden diesmal von den 4 verschiedenen, mit Hilfe einer schwachen Säure wie Tetrazol aktivierten Phosphoramidit-Derivaten benetzt. Durch die Kopplung der aktivierten Phosphoramidite an das freie 5'-OH-Ende findet eine Kettenverlängerung um eine Base statt (Fig. 5).

- 10 Im nächsten Schritt werden evtl. verbliebene freie 5'-OH-Enden mit einem "Cap" versehen, sodaß sie an späteren Reaktionen nicht mehr teilnehmen können (Fig. 6).

Ein letzter Schritt, in dem trivalente Phosphatgruppen oxidiert werden beschließt den Syntheszyklus (Fig. 7).

- 15 Die oben beschriebene Synthese entspricht dem dem Fachmann geläufigen Standard der Oligonukleotidsynthese. Im Unterschied zu der geläufigen Standardsynthese werden allerdings die Oligonukleotide derart auf dem festen Träger verankert, daß sie nach der abschließenden vollständigen Abspaltung der Schutzgruppen nicht von dem Träger abgespalten werden, 20 sondern an den Träger gekoppelt verbleiben.



Anschließend wird die DMTr- Schutzgruppe wiederum mithilfe von TCA vom 5'-OH Ende abgespalten, sodaß sich auf dem oben beschriebenen Träger in diesem Stadium 16 unterteilte voneinander abgegrenzte Bereiche befinden, mit jeweils einem von 16 möglichen über das 3'-Ende durch einen Spacer an den Träger gekoppelten Dinukleotiden deren 5'-Ende eine freie OH-Gruppe trägt.

Für die nächsten Kopplungsschritte werden die oben beschriebenen aktivierten Phosphoramidit-Derivate einzeln statt in Acetonitril in einem geeigneten bei 50 °C flüssigen, bei 4 °C festen Lösungsmittel gelöst, ein geeigneter das Laserlicht absorbierender und in Bezug auf die aktivierten Nukleoside inerter Farbstoff, insbesondere Graphitpartikel, zugegeben, die Lösung tiefgefroren und in kleine Partikel zerrieben.

Diese Partikel werden bei 4 - 10 °C auf den über einem Array von Mikrolasern fest montierten Träger gestäubt, eine Abdeckplatte darüber gelegt und ausgewählte Bereiche für 20-30 Minuten mit den Mikrolasern bestrahlt. Die Absorption des Laserlichts durch den beigemengten Farbstoff erwärmt dabei lokal in den bestrahlten Bereichen das bei den gewählten Temperaturen gefrorene Lösungsmittel und ermöglicht damit die Kopplung der aktivierten Phosphoramidit-Derivate an die freien 5'-OH-Enden ausschließlich in diesen Bereichen. Anschließend wird die Abdeckplatte entfernt, und die nicht gekoppelten Phosphoramidit-Derivate werden mit kaltem Acetonitril gewaschen. Anschließend wird dieser Waschvorgang mit erwärmtem Acetonitril 2x wiederholt.

Dieser Vorgang wird insgesamt 4x mit allen aktivierten Phosphoramidit-Derivaten wiederholt, sodaß die oben beschriebenen 16 voneinander abgegrenzten Bereiche in 4 x 16 definierte Bereiche unterteilt werden, gefolgt von dem oben beschriebenen "Capping" verbliebener freier 5'-OH-Enden, der Oxidation der trivalenten Phosphatgruppen und einer erneuten Abspaltung der DMTrSchutzgruppen mit TCA.

Die Verlängerung der Oligonukleotide um weitere 9 Basen erfolgt anschließend analog zur Synthese der 3. Base, wobei wie oben beschrieben bei jedem Syntheseschritt jeder Bereich in 4 definierte Bereiche unterteilt wird.

Schließlich werden alle Schutzgruppen mit Dichlormethan und Trichlor-essigsäure abgespalten, der Träger mit Acetonitril gewaschen und getrocknet, sodaß im Endeffekt ein Träger mit  $4^{12} = 16.777.216$  verschiedenen Bereichen entsteht, die jeweils eines von allen möglichen über das 3'-Ende gekoppelten 12mer Oligonukleotiden repräsentieren.

g) Untersuchung von Patienten-DNA unter Verwendung eines Arrays von Mikrolasern mit einer auf einem Träger fixierten 12mer Oligonukleotidbibliothek

Der unter Beispiel f) beschriebene Träger mit einer darauf fixierten vollständigen Oligonukleotid-Bibliothek wird mit Patienten-DNA gefärbt.

Unspezifische Bindungen werden z.B. mit DNA aus Heringsspermien abgesättigt.

Dem Patienten wird eine Tumor-Gewebsprobe und gleichzeitig eine Probe mit gesundem Gewebe entnommen und die darin enthaltene genomische DNA mithilfe eines oder mehrerer Paare von Tumorgen-spezifischen Primern (spezifisch z.B. für die Gene von p53, p16, ras, c-myc, n-myc) in einer Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Dabei werden FITC-markierte dNTPs in die Tumorprobe eingebaut, bzw. die Normalprobe mit biotinylierten dNTPs markiert, die Proben gemischt und auf den Träger hybridisiert. Anschließend wird die hybridisierte Probe nachgefärbt mit einem chemisch gekoppelten Protein aus Streptavidin und Phycoerythrin an das zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt wurde. Dadurch kann mit einer Anregungswellenlänge 2 verschiedene Fluoreszenzen gemessen werden.

Wie in Beispiel e) beschrieben, wird anschließend sequentiell jeweils ein Mikrolaser nach dem anderen angeschaltet und das von evtl. gebundenen Fluoreszenzmolekülen emittierte Licht mithilfe eines gröberen Rasters von Photodioden über dem Array von Mikrolasern ausgelesen, wobei jeweils die Diode im Intensitätsmaximum des gerade aktiven Anregungslasers ausgeschaltet ist. Das von dem Anregungslaser verursachte Streulicht wird zusätzlich durch einen geeigneten Wellenlängenfilter von dem Fluoreszenzlicht abgetrennt. Der Wellenlängenfilter wird dabei einmal auf den Fluoreszenzfarbstoff FITC und zum anderen auf den Tandemfarbstoff Phycorythrin-Cy5 (PE-Cy5) abgestimmt.

Die Fluoreszenzsignale werden dann jeweils in insgesamt 10 unterschiedliche Helligkeitsstufen unterteilt, die den einzelnen Mikrolasern (d.h. in diesem Fall den unterschiedlichen Oligonukleotiden) zugeordnet werden.


Die Mikrolaser, die in einem ersten Durchlauf ein von den anderen Bildpunkten auffällig unterschiedliches Verhältnis der FITC-Färbung zur PE-Cy5-Färbung ergaben, werden anschließend mehrfach hintereinander zur Anregung verwendet, wonach die dabei erhaltenen Fluoreszenzsignale aufsummiert werden und erneut das Verhältnis der FITC-Färbung zur PE-Cy5-Färbung bestimmt wird.

Auf diese Weise können Punktmutationen in Genen, die für die Prognose von Tumorerkrankungen wichtig sind, diagnostiziert werden. Im Unterschied zu den auf dem Markt befindlichen Systemen können mit einer vollständigen 12mer Oligonukleotidbibliothek viele Gene gleichzeitig analysiert werden.

In einem alternativen Ansatz dient die dem Patienten entnommene DNA als Template für die Vervielfältigung mit sogenannten Alu-Primern, die an die Ränder von sehr häufig im Genom vorkommenden repetitiven Alu-Sequenzen hybridisieren und die zwischen 2 Alusequenzen liegende nicht-repititive DNA vervielfältigen. Wieder werden FITC-markierte dNTPs in die Tumprobe bzw. biotinylierte dNTPs in die Normalprobe eingebaut, die Proben gemischt auf den Träger hybridisiert.

Das Auslesen der Fluoreszenzsignale erfolgt anschließend wie oben beschrieben. Auf diese Weise wird das gesamte Genom auf Unterschiede zwischen normalem und Tumorgewebe abgerastert, wodurch neue diagnostische Marker entdeckt werden können, die wichtige Informationen für die


5 Tumorprogression liefern.



h) Kombination des Fluoreszenzdetektors gemäß Beispiel d) mit einem Massenspektrometer

Der Fluoreszenzdetektor gemäß Beispiel d) bzw. nur der CD-Brennerteil ohne zusätzliche Fluoreszenz-Optik wird mit einem evakuierbaren Gefäß

10 umhüllt. An der Stelle des normalen Probenhalters eines Massenspektrometers befindet sich der Brennpunkt des Brennlasers. Der Brennlaser kann beliebige Punkte auf der CD ansteuern und die darauf befindlichen Moleküle wegsprengen, die dann mittels des Massenspektrometers untersucht werden können.



15 Ein solchermaßen kombiniertes Gerät erlaubt es, die Bindungspartner zu analysieren, die sich bei der Kombination von zwei hochkomplexen Molekülbibliotheken bilden, während es bei den bislang bekannten Techniken nur möglich ist, zwei Molekülbibliotheken miteinander zu kombinieren und zu analysieren, die um mehrere Größenordnungen weniger komplex sind.

Statt einem Massenspektrometer kann im übrigen auch eine bewegliche Vorrichtung angebracht werden, mit der Phagen oder DNA von einzelnen Pits der CD zurückgewonnen werden können.

i) Sequenzierung komplexer DNA mittels festphasen-gekoppelter Oligos

5 Verwendet wird die in Beispiel f) beschriebene vollständige 12mer Oligonukleotidbibliothek. Im Unterschied zu Beispiel f) muß hierbei jedoch die Syntheserichtung "umgedreht" werden, d.h. die analog DMTr absaltbare Schutzgruppe muß sich am dafür am 3'-OH-Ende befinden, so daß am Ende eine festphasengekoppelte Oligonukleotidbibliothek mit freien 3'-

10 Enden vorliegt. Die Hybridisierungsbedingungen werden dabei so gewählt, daß es - wenn überhaupt - nur zu sehr wenigen Mismatches zwischen den Oligonukleotiden und den daran hybridisierten Templates kommt. Die Komplexität der festphasen-gekoppelten Oligonukleotide sollte die der zu sequenzierenden DNA übertreffen. Nicht hybridisierte cDNA wird weg-

15 gewaschen. Eine Sequenzreaktion nach Sanger mit vergleichsweise vielen ddNTPs in der Reaktionslösung wird durchgeführt, so daß im Schnitt eine Verlängerung der Oligoprimer um durchschnittlich 20 Nukleotide stattfindet. Danach wird das Template durch Hitze wieder abgelöst. Anschließend wird die Sequenzinformation in dem in Beispiel h) beschriebenen

20 kombinierten CD-Brenner-Massenspektrometer ausgelesen, wobei der Brennlaser ausgewählt, durch die Sequenzreaktion verlängerte Oligonukleotide verdampft, so daß die Sequenzinformation dann mittels des Massenspektrometers detektiert werden kann.

## Bezugszeichenliste

- 2 an den Träger gekoppelte Moleküle
- 3 Matrixschicht
- 4 Aggregate, die an an den Träger gekoppelte Moleküle binden
- 5 Substanzen
- 6 elektromagnetische Wellen
- 7 lokal engbegrenzter, ausgewählter Bereich
- 8 andere Moleküle, die mit an den Träger gekoppelten Molekülen (2), oder die mit Aggregaten an diese Moleküle (4) in Wechselwirkung treten
- 9 immobilisierte Substanzen
- 10 Oberseite
- 11 beweglich gemachte Substanzen
- 12 Träger
- 13 elektromagnetische Wellen oder angelegte Spannung
- 14 Moleküle
- 15 unterschiedliche Substanzen
- 16 Achse
- 17 Mischarray
- 18 Bewegungspfeil
- 19 Quellen elektromagnetischer Strahlung
- 20 Pit
- 21 Isolator
- 22 Bewegungspfeil
- 23 Array von einzeln ansteuerbaren Detektoren

- 
- 24 Fokussierlinse
  - 25 größerer Bereich, der mehrere ausgewählte Bereiche (7)  
umfaßt
  - 26 Laserstrahlen
  - 27 Detektor
  - 28 Detektor
  - 29 Leuchtdiode, die gleichzeitig als Detektor verwendet werden  
kann
  - 30 Linse
  - 32 emittierte Lichtstrahlen
  - 40 Array von Mikrolasern
  - 42 Mikrolaser
  - 44 Mikrolaser
  - 46 Oberseite eines Trägers
  - 48 Träger
  - 50 Moleküle/-gruppe
  - 52 Moleküle/-gruppe
  - 54 Array von Detektoren
  - 56 Detektor
  - 58 Detektor
  - 60 Wellenlängenfilter
  - 62, 62' Anregungsstrahlung (Strahlung eines Mikrolasers)
  - 64 Lumineszenzstrahlung



## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen, wobei elektromagnetische Wellen (Anregungslicht), insbesondere Laserlicht, auf den Träger eingestrahlt und eventuelle Lumineszenz-Reaktionen, der auf dem Träger gebundenen Molekülen, von einem Detektor erfaßt werden,  
*dadurch gekennzeichnet,*  
daß im wesentlichen nur das von den Molekülen emittierte Licht (Detektionslicht) von dem Detektor erfaßt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, dadurch gekennzeichnet, daß* Anregungslicht und Detektionslicht räumlich separiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet, daß* Anregungslicht und Detektionslicht zeitlich separiert werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Detektor und der Träger nach dem Einstrahlen oder während des Einstrahlens der elektromagnetischen Wellen relativ zueinander bewegt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger und Detektor relativ zueinander so gedreht werden, daß sich die mit

den elektromagnetischen Wellen bestrahlten Moleküle in einen von dem Detektor erfassbaren Bereich bewegen.

5 6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Relativbewegung von Träger und Detektor in einer Zeitspanne stattfindet, die in der Größenordnung der Fluoreszenz-Lebensdauer der angeregten Moleküle liegt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß* die elektromagnetischen Wellen nur kurzzeitig, insbesondere gepulst, auf den Träger eingestrahlt werden.

10 8. Verfahren nach Anspruch 7, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Detektor während des Einstrahlens eventuell von den bestrahlten Molekülen emittiertes Licht nicht erfaßt.

15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Detektor nach dem Einstrahlen zeitverzögert von den bestrahlten Molekülen emittiertes Licht erfaßt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Array aus einer Anzahl von gezielt ansteuerbaren Lichtquellen verwendet wird.

20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Array aus Detektoren verwendet wird.

- 
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, bei welchem eine Anzahl von Lichtquellen und eine Anzahl von Detektoren verwendet werden, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder Lichtquelle wenigstens ein Detektor zugeordnet ist.
- 5 13. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder einer Lichtquelle zugeordnete Detektor während des Betriebs der Lichtquelle passiv geschaltet wird.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder einer Lichtquelle zugeordnete Detektor während des Betriebs der Lichtquelle aktiv geschaltet wird.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet, daß* zur Anregung der Moleküle zwecks Erfassung bestimmter optischer Eigenschaften und als Detektor zur Erfassung dieser Eigenschaften ein Mischarray aus Mikrolasern und Detektoren verwendet wird.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Array von Detektoren als Träger der Moleküle verwendet wird.
- 20 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei ein Array von Detektoren verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* mehrere Detektoren eines Arrays von Detektoren gleichzeitig mit elektromagnetischen Wellen angeregt werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei ein Array von Detektoren verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* sich zwischen den einzelnen Detektoren eines Arrays von Detektoren eine lichtundurchlässige Schicht befindet.
- 5 19. Verfahren nach Anspruch 18, *dadurch gekennzeichnet, daß* die lichtundurchlässige Schicht zwischen den einzelnen Detektoren eines Arrays von Detektoren über die Ebene der gebundenen Moleküle herausragt.
- 10 20. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger ein Partikel, insbesondere eine Zelle ist, der mit einem FACS-Gerät (Fluoreszenz Aktivierter Cell Sorter oder Cell Scanner) analysiert wird.
21. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert wird.
- 15 22. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert wird.
23. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger mit einem Phospho-Imager analysiert wird.
- 20 24. Verfahren nach Anspruch 1, wobei auf den Träger ein Array von Molekülen aufgebracht ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewähl-

te Bereiche des Trägers kurzzeitig mit elektromagnetischen Wellen, insbesondere mit gepulstem Licht bestrahlt werden.

- 5
25. Verfahren nach Anspruch 24, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Bereiche des Trägers nach dem Prinzip des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops analysiert werden.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, *dadurch gekennzeichnet, daß* Fluoreszenzsignale einzelner Bildpunkte des Arrays von Molekülen in unterschiedlichen Fokussierungsebenen gemessen werden.
- 10
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Stärke der Fluoreszenzsignale in unterschiedlichen Fokussierungsebenen mit der Einstellung der Fokussierungsebene rückgekoppelt wird.
- 15
28. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger ein Trennmedium, insbesondere ein chromatographisches Trennmedium ist, durch das ein Molekülgemisch zeitlich und/oder räumlich aufgetrennt wird, und daß die aufgetrennten Moleküle durch einen oder mehrere Laser analysiert werden.
- 20
29. Verfahren nach Anspruch 28, *dadurch gekennzeichnet, daß* das chromatographisch aufgetrennte Molekülgemisch durch eine Sequenzierungsreaktion entstanden ist.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein optisches Abbildungssystem zwischen das Anregungssystem und den Träger eingebracht wird.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 30, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein optisches Abbildungssystem zwischen den Träger und das Detektionssystem eingebracht wird.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein optisches Abbildungssystem verwendet wird, das wenigstens ein Linsensystem oder ein Array von Linsensystemen aufweist.
33. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens ein optisches Gitter umfaßt.
34. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens einen optischen Spiegel oder ein Array aus optischen Spiegeln umfaßt.
35. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem optische Fasern oder ein Array aus optischen Fasern umfaßt.
36. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem ein Gradienten-Index-Linsensystem

(Gradient-index-lens-System) oder ein Array aus Gradienten-Index-Linsensystemen umfaßt.

- 5 37. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger und Anregungslichtquelle relativ zueinander fixiert werden.
- 10 38. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Anregungslichtquelle ein Array von Anregungslichtquellen verwendet wird, die an den Träger fixiert sind.
- 15 39. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger, Anregungslichtquelle und Detektor relativ zueinander fixiert sind.
- 20 40. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Anregungslichtquelle ein Array von Anregungslichtquellen verwendet wird, die an dem Träger und dem Detektor fixiert sind.

41. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Mischarray aus Anregungslichtquellen und Detektoren verwendet wird, die relativ zum Träger fixiert sind.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 37 bis 41, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein gleichmäßig mit einem Lumineszenzfarbstoff markierter Träger verwendet wird und daß das dabei erhaltene Lumineszenzsignal zum Kalibrieren der einzelnen Anregungslichtquellen des Arrays verwendet wird.
43. Verfahren zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen oder biologisch relevanter Moleküle, wobei elektromagnetische Wellen auf den Träger eingestrahlt und die bestrahlten Moleküle mit einem Detektor beobachtet werden, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Moleküle von dem Träger abgelöst werden und einem zweiten Detektor zur Erfassung weiterer, nicht notwendigerweise optischer Eigenschaften zugeführt werden.
44. Verfahren nach Anspruch 43, *dadurch gekennzeichnet, daß* die ausgewählte Moleküle von dem Träger automatisch abgelöst werden.
45. Verfahren nach Anspruch 43 oder 44, *dadurch gekennzeichnet, daß* die ausgewählten Moleküle vor der Erfassung weiterer, nicht



notwendigerweise optischer Eigenschaften insbesondere durch Polymerase-Kettenreaktion oder biologische Replikation vervielfältigt werden.

- 5 46. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über einen photolabilen Linker erfolgt.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über eine Ionisierung bewirkt wird.
- 10 48. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle durch elektromagnetische Strahlung bewirkt wird.
- 15 49. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle durch Anlegen einer elektrischen Spannung bewirkt wird.
50. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über eine enzymatische Reaktion bewirkt wird.

51. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über Veränderung der Ionenkonzentration bewirkt wird.
52. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle über Veränderung des pH-Wertes bewirkt wird.
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Ablösung der Moleküle mit Hilfe eines Katalysators bewirkt wird.
- 10 54. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 53, *dadurch gekennzeichnet, daß* die abgelösten Moleküle Bestandteil von Liposomen, Viruspartikeln, Retroviren, Bakteriophagen, Viroiden oder Zellen, insbesondere B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Leukozyten oder Bakterien sind.
- 15 55. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 53, *dadurch gekennzeichnet, daß* die abgelösten Moleküle Bestandteil von Komplexen aus Nukleinsäure und Protein, insbesondere von "Ribosomal display"-Komplexen oder von mit DNS-bindenden Fusionsproteinen beladener DNS, sind.
- 20 56. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 53, *dadurch gekennzeichnet, daß* die abgelösten Moleküle Bestandteil von Komplexen

aus Nukleinsäure und anderen Molekülen, insbesondere künstlich hergestellten Komplexen aus DNS und einem Liganden, sind.

57. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 56, *dadurch gekennzeichnet, daß* vom zweiten Detektor ein Massenspektrogramm der abgelösten Moleküle erzeugt wird.

58. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die ausgewählten Moleküle durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, insbesondere durch Einstrahlung von Laserlicht, von dem Träger abgelöst werden.

10 59. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Moleküle durch Anlegen einer elektrischen Spannung von dem Träger abgelöst werden.

60. Verfahren nach Anspruch 59, *dadurch gekennzeichnet, daß* die elektrische Spannung im Träger erzeugt wird.

15 61. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 45, *dadurch gekennzeichnet, daß* die ausgewählten Moleküle vor der Ablösung vom Träger durch enzymatische Reaktionen verändert werden.

62. Verfahren nach Anspruch 61, *dadurch gekennzeichnet, daß* die enzymatische Veränderung durch eine Polymerisationsreaktion

mittels einer Template-abhängigen DNA-Polymerase hervorgerufen wurde.

- 5 63. Verfahren nach Anspruch 61 oder 62, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Polymerisationsreaktion durch das Beifügen von ddNTPs zu einer Schar von unterschiedlich verlängerten Oligonukleotiden führt.
- 10 64. Verfahren zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 63, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger mit integriertem und von einem Detektor erfaßbaren Positionsmarkierungen verwendet wird.
- 15 65. Verfahren nach Anspruch 64, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Träger eine im wesentlichen handelsübliche Compact Disc (CD), eine Digital Video Disc (DVD), eine Magneto-Optical Disc (MOD) oder dergleichen verwendet wird.
- 20 66. Verfahren nach Anspruch 65, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchenden Moleküle auf der einen Flachseite und die Positionsmarkierungen auf der anderen Flachseite des Trägers aufgebracht werden.
67. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 bis 66, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein lichtdurchlässiger Träger verwendet wird.

68. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 bis 67, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, der einen Wellenlängenfilter enthält.
69. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 67, *dadurch gekennzeichnet, daß* zwischen Träger und Detektor wenigstens ein Wellenlängenfilter geschaltet wird.
70. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 69, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine Molekülbibliothek aufgebracht ist.
- 10 71. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine vorzugsweise vollständige Peptidbibliothek, die L-Aminosäuren enthält, insbesondere eine 4mer, 5mer, 6mer oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht ist.
- 15 72. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine vorzugsweise vollständige Peptidbibliothek, die D-Aminosäuren enthält, insbesondere eine 4mer, 5mer, 6mer oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht ist.
- 20 73. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine Peptidbiblio-

thek aus L- und D-Aminosäuren, insbesondere eine 4mer, 5mer, 6mer oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht ist.

5 74. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine Aptamerbibliothek aufgebracht ist.

75. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine Oligosaccharidbibliothek aufgebracht ist.

10 76. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine mit Hilfe chemischer Kombinatorik hergestellte Molekülbibliothek aufgebracht ist.

15 77. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Träger verwendet wird, auf den eine vorzugsweise vollständige Oligonukleotidbibliothek, insbesondere eine 12-, 13-, 14- oder 15mer Oligonukleotidbibliothek aufgebracht ist.

78. Verfahren nach Anspruche 77, *dadurch gekennzeichnet, daß* die einzelnen Monomere der Oligonukleotidbibliothek Spiegelbilder der natürlicherweise vorkommenden Monomere sind.

79. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, *dadurch gekennzeichnet, daß* auf ein Träger verwendet wird, auf den Proteine, insbesondere rekombinant exprimierte Proteine, DNA-Fragmente, PCR-Produkte, cDNA-Fragmente oder RNA-Fragmente aufgebracht sind.

5

80. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 79, wobei ein Träger verwendet wird, auf den eine Molekülbibliothek aufgebracht ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Molekülbibliothek chemisch modifiziert wurde, insbesondere durch eine Additionsreaktion, eine Eliminierungsreaktion, eine Substitutionsreaktion, eine Umlagerungsreaktion oder eine Anlagerungsreaktion mit bereits am Träger gebundenen Substanzen.

10


81. Verfahren nach einem der Ansprüche 70 bis 80, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger mit einer zu untersuchenden Flüssigkeit in Kontakt gebracht wird.

15

82. Verfahren nach Anspruch 81, *dadurch gekennzeichnet, daß* es sich bei der zu untersuchenden Flüssigkeit um Blut, Blutserum, Urin, Faeces, Lymphe, Speichel, Fruchtblasenflüssigkeit, Magensaft, Erbrochenes, Schweiß, Samenflüssigkeit, Muttermilch, Tränenflüssigkeit, um eine Antikörper enthaltende Flüssigkeit oder um ein Extrakt aus den angegebenen Flüssigkeiten handelt.


20

83. Verfahren nach Anspruch 82, wobei die zu untersuchende Flüssigkeit insbesondere ein Blutserum ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird.

5  84. Verfahren nach Anspruch 83, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline des Typs E spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird.

10 85. Verfahren nach Anspruch 83, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline des Typs M spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird.

86. Verfahren nach Anspruch 83, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline des Typs G spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird

15  87. Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 83, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit mit einem für Immunglobuline des Typs A spezifischen Nachweisreagens in Kontakt gebracht wird.

20 88. Verfahren nach einem der Ansprüche 70 bis 80, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger mit zu untersuchender DNA in Kontakt gebracht wird.



5 89. Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 89, wobei DNA oder eine Immunglobuline enthaltende Flüssigkeit zu untersuchen ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* die zu untersuchende Flüssigkeit oder die zu untersuchende DNA nach oder vor dem In-Kontakt-Bringen mit dem Träger mit einem mit Immunglobulinen oder mit DNA reagierenden, insbesondere Bindungen eingehenden Stoff in Kontakt gebracht wird.

10 90. Verfahren nach Anspruch 89, *dadurch gekennzeichnet, daß* der mit Immunglobulinen oder DNA reagierende Stoff vor dem In-Kontakt-Bringen mit der zu untersuchenden Flüssigkeit oder der zu untersuchenden DNA mit einem zur Lumineszenz anregbaren Stoff eingefärbt wird.

15 91. Verfahren nach Anspruch 89 oder 90, *dadurch gekennzeichnet, daß* der mit Immunglobulinen oder DNA reagierende Stoff vor oder während des In-Kontakt-Bringens mit der zu untersuchenden Flüssigkeit oder der zu untersuchenden DNA mit einem weiteren Stoff gekoppelt wird, der eine Lumineszenz hervorrufen kann, insbesondere mit Enzymen oder Vorstufen lumineszenter Stoffe.

20 92. Verfahren nach Anspruch 91, *dadurch gekennzeichnet, daß* der weitere Stoff ein Enzym ist, insbesondere Meerettich-Peroxidase, Alkalische Phosphatase, Beta-Galaktosidase, Glukose-Oxidase, Lactat-Dehydrogenase oder Luziferase, oder eine Bindung von Enzymen bewirkt.

93. Verfahren nach einem der Ansprüche 90 bis 92, *dadurch gekennzeichnet, daß* als zur Lumineszenz anregbarer Stoff ein durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen, insbesondere Laserlicht oder Licht aus Leuchtdioden zur Fluoreszenz anregbarer Farbstoff verwendet wird.

5

94. Verfahren zur systematischen Klassifizierung und Segmentierung von pathologischen Mustern, insbesondere zur Bestimmung von diagnostischen Markern, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 93 für eine Vielzahl von Testpersonen durchgeführt wird und in den Testergebnissen die Abweichungen von der Normalverteilung ermittelt werden.

10

95. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* von jeder Testpersonen jeweils eine Probe Blutserum gewonnen und nach einem der genannten Verfahren untersucht wird.

96. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an Krebs erkrankt sind, ermittelt werden.

15

97. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor, während oder nach der Gewinnung des Blutserums einen Herzinfarkt oder Schlaganfall erlitten haben, ermittelt werden.

20

98. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an der Parkinsonschen Krankheit erkrankt sind, ermittelt werden.

5 99. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an Multipler Sklerose erkrankt sind, ermittelt werden.

10 100. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an der Alzheimerschen Krankheit erkrankt sind, ermittelt werden.

15 101. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor, während oder nach der Gewinnung des Blutserums an Infektionskrankheiten erkrankt sind, ermittelt werden.

20 102. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an einer Autoimmunkrankheit erkrankt sind, ermittelt werden.

103. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor, während oder nach der Gewinnung des Blutserums Allergiker waren oder wurden, ermittelt werden.

5 104. Verfahren nach Anspruch 95, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abweichungen von der Normalverteilung für Testpersonen, die vor oder nach der Gewinnung des Blutserums an Morbus Crohn erkrankt sind, ermittelt werden.

10 105. Verfahren zur automatischen Klassifizierung von Signalen, insbesondere zur Bestimmung von diagnostischen Mustern, *dadurch gekennzeichnet, daß* die nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 104 erhaltenen Signale mit Strukturparametern der entsprechenden Moleküle der Molekülbibliothek in Beziehung gebracht werden und so Korrelationen aufgefunden werden, insbesondere solche, die eine diagnostische Beurteilung von Mustern unbekannter Proben ermöglichen.

20 106. Verfahren zur automatischen Klassifizierung von Signalen, *dadurch gekennzeichnet, daß* die nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 81 bis 104 erhaltenen Signale mit Strukturparametern der entsprechenden Moleküle der Molekülbibliothek in Beziehung gebracht werden, insbesondere um gemeinsame Strukturmerkmale der aufgefundenen Moleküle aufzufinden.

107. Verfahren nach Anspruch 106, *dadurch gekennzeichnet, daß* so definierte Strukturmerkmale der aufgefundenen Moleküle als Leitstrukturen für die Entwicklung funktionshomologer anderer Moleküle, insbesondere therapeutisch anwendbarer Moleküle, dienen.

5 108. Verfahren zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, insbesondere nach einem der vorangehenden Ansprüche, *dadurch gekennzeichnet, daß* an einem Träger ein Array von gezielt anregbaren Quellen elektromagnetischer  
10 Strahlung, insbesondere ein Array von Mikrolasern oder Leuchtdioden befestigt wird.

109. Verfahren nach Anspruch 108, *dadurch gekennzeichnet, daß* das Array an dem Träger befestigt wird, bevor die auf dem Träger gebundenen Moleküle, insbesondere eine Peptid-, Aptamer-, Oligosaccharid-, Oligonukleotidbibliothek oder eine mit Hilfe chemischer Kombinatorik hergestellte Molekülbibliothek, auf den Träger aufgebracht werden.

110. Verfahren nach Anspruch 108 oder 109, *dadurch gekennzeichnet, daß* das Array an dem Detektor befestigt wird, bevor die auf dem Träger gebundenen Moleküle, insbesondere eine Peptid-, Aptamer-, Oligosaccharid-, Oligonukleotidbibliothek oder eine mit Hilfe chemischer Kombinatorik hergestellte Molekülbibliothek, auf den Träger aufgebracht werden.  
20

111. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 110, *dadurch gekennzeichnet, daß* das Array an dem Träger und an einem Detektor oder einem Array von Detektoren befestigt wird.
- 5 112. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 111, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Mischarray von gezielt anregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, insbesondere von Mikrolasern oder Leuchtdioden, und Detektoren verwendet wird.
- 10 113. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 112, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Befestigung des Trägers an den Array von gezielt anregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, insbesondere an einen Array von Mikrolasern oder an einen Array von Leuchtdioden, während des Aufbringens der Molekülbibliothek, des In-Kontakt-Bringens der Molekülbibliothek mit einer zu untersuchenden Flüssigkeit nach einem der Ansprüche 81 bis 93, bis zum Auslesen der Lumineszenz-Reaktion erhalten bleibt.
- 15 114. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 112, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Abbildungssystem nach Anspruch 30 bis 36 das Array von Anregungslasern auf den Träger abbilden.
- 20 115. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 114, *dadurch gekennzeichnet, daß* Detektor, die gezielt anregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung und Träger zumindest während der Untersuchung relativ zueinander fixiert sind.

116. Verfahren zum Aufbringen einer Peptidbibliothek auf einen Träger, insbesondere auf einen in einem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche verwendbaren Träger,

*dadurch gekennzeichnet, daß*

- 5 - eine Oberfläche des Trägers mit einer Kunststoffschicht überzogen wird, die freie Aminogruppen enthält und für die Festphasensynthese einer Peptidbibliothek geeignet ist,
- daß freie Aminogruppen mit einer durch Licht abspaltbaren Schutzgruppe abgeblockt werden,
- 10 - daß mittels eines Lasers Schutzgruppen in bestimmten Bereichen des Trägers abgespalten werden,
- daß eine aktivierte Aminosäure, deren eigene Aminogruppe durch die durch Licht abspaltbare Schutzgruppe blockiert ist, auf den Träger so aufgebracht wird, daß sich die Aminosäure auf dem Träger verteilt und an die freien Aminogruppen
- 15 ankoppelt,
- daß die Verfahrensschritte "Abspalten von Schutzgruppen in bestimmten Bereichen des Trägers" und "Zuführen einer aktivierten Aminosäure, deren eigene Aminogruppe durch die durch Licht abspaltbare Schutzgruppe blockiert ist", für
- 20 verschiedene, vorzugsweise alle 20 Aminosäuren wiederholt wird und
- daß schließlich die Schutzgruppen von allen synthetisierten Peptiden abgespalten werden.

117. Verfahren zum Aufbringen einer Peptidbibliothek auf einen Träger, insbesondere auf einen in einem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche verwendbaren Träger,

*dadurch gekennzeichnet, daß*

- in einem Spacer, der eine freie, mit einer durch Licht abspaltbaren Schutzgruppe abgeblockte Amino- oder OH-Gruppe enthält, Monomere für die Synthese einer Molekülbibliothek aktiviert und mit einem Lösungsmittel, das einen Schmelzpunkt zwischen 0 °C und 40 °C hat, bei einer Temperatur, bei der das Lösungsmittel flüssig ist, gelöst werden,
- daß dem Gemisch aus Spacer und Lösungsmittel ein Farbstoff, der von einem Laser eingestrahltes Licht absorbieren kann, zugeführt wird,
- daß das Gemisch tiefgefroren und pulverisiert wird,
- daß das pulverisierte und tiefgefrorene Gemisch im festen Zustand über dem Träger zerstäubt wird,
- daß ausgewählte Bereiche auf dem Träger mit elektromagnetischen Wellen, insbesondere Laserlicht, derart bestrahlt werden, daß es zu einem Auftauen des Gemischs und einer Ankopplung an den Träger kommt,
- daß das nicht verflüssigte, nicht gekoppelte Gemisch mit Lösungsmittel, vorzugsweise erwärmten Lösungsmittel vom Träger gewaschen wird und
- daß die Schutzgruppe durch Einstrahlung von Licht abgespalten wird.



118. Verfahren zur Aufbringung einer Molekülbibliothek auf einen Träger, insbesondere eine Flachseite einer Compact Disc, *dadurch gekennzeichnet,*

- daß mittels einer Vorrichtung, insbesondere mittels einer Düse aufweisenden Vorrichtung, Moleküle auf den Träger aufgebracht werden und
- daß ausgewählte Bereiche des Trägers mit Laserlicht derart bestrahlt werden, daß es in diesen Bereichen zu einer Verankerung der aufgetragenen Moleküle am Träger kommt.

119. Verfahren zum Aufbringen von Substanzen (5), insbesondere von Molekülen auf einen Träger (12),

*dadurch gekennzeichnet,*

- daß eine immobilisierte Substanz (9) in einem lokal engbegrenzten, ausgewählten Bereich (7) durch Veränderung der physikalischen Umgebung, insbesondere der Matrixschicht (3), beweglich gemacht wird,
- daß die so beweglich gemachte Substanz (11) durch einen physikalischen Prozeß in die Nähe des Trägers (12), insbesondere der Trägersoberfläche (46), gebracht wird,
- daß die so beweglich gemachte Substanz (11) an auf dem Träger (12) befindliche Moleküle (2) oder Atome bindet, oder ein Aggregat (4) bildet, oder mit diesen eine chemische Reaktion eingeht.
- daß die so beweglich gemachten Substanzen (11) viele unterschiedliche Substanzen (15) sind oder ergeben.

120. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz geschmolzen wird.
121. Verfahren nach Anspruch 119 oder 120, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen geschmolzen wird.
122. Verfahren nach Anspruch 119 oder 120, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers geschmolzen wird.
- 10 123. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz in einen gel-artigen Zustand gebracht wird.
- 15 124. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 123, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen in einen gel-artigen Zustand gebracht wird.
- 20 125. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 123, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine feste Substanz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers in einen gel-artigen Zustand gebracht wird.

126. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz thermisch abgespalten wird.
127. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 126, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen thermisch abgespalten wird.
128. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 126, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers thermisch abgespalten wird.
129. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz löslich gemacht wird.
130. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 129, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher immobilisierte Substanz durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen löslich gemacht wird.
131. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 129, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen eine vorher

immobilisierte Substanz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers löslich gemacht wird.

132. Verfahren nach Anspruch 119, *dadurch gekennzeichnet, daß* in ausgewählten Bereichen des Trägers eine vorher immobilisierte Substanz durch Freisetzung aus cage-Strukturen löslich gemacht wird, insbesondere durch Freisetzung aus Fullerenen oder Nanotubes.

133. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 oder 132, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Freisetzung der Moleküle durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen oder Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Teil des Trägers bewirkt wird.

134. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 133, *dadurch gekennzeichnet, daß* die vorher feste oder immobilisierte Substanz einen Stoff enthält, der eingestrahlte elektromagnetische Wellen absorbiert.

135. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 134, *dadurch gekennzeichnet, daß* die vorher feste oder immobilisierte Substanz Moleküle enthält, die nach Beweglichmachung an den Träger koppeln können.

136. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 134, *dadurch gekennzeichnet, daß* die vorher feste oder immobilisierte Substanz

Moleküle enthält, die nach Beweglichmachung mit an den Träger bereits gekoppelten Molekülen eine Reaktion eingehen können.

5 137. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 134, *dadurch gekennzeichnet, daß* die vorher feste oder immobilisierte Substanz aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere für die Molekülsynthese enthält, die im beweglichen Zustand an den Träger koppeln können.

138. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 137, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste oder immobilisierte Substanz einen Schmelzpunkt zwischen 0 °C und 45 °C hat.

10 139. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 138, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Schmelzpunkt zwischen 0 °C und 45 °C durch die Mischung von Lösungsmitteln mit unterschiedlichem Schmelzpunkt erreicht wird.

15 140. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 139, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste Substanz eine weitere Substanz enthält, die eingestrahlte elektromagnetische Wellen absorbiert, insbesondere Graphitpartikel.

20 141. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 139, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste Substanz eine weitere Substanz enthält, insbesondere Fullerene oder Nanotubes, die eingestrahlte elektromagnetische Wellen absorbiert.

5 142. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 139, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste Substanz eine weitere Substanz, insbesondere Fullerene oder Nanotubes enthält, die eine oder mehrere weitere Substanzen enthalten, die eingestrahlte elektromagnetische Wellen absorbieren.

143. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 142, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste oder immobilisierte Substanz pulverisiert wird, insbesondere, nachdem sie tiefgefroren wurde.


10 144. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 143, *dadurch gekennzeichnet, daß* die feste oder zu immobilisierende Substanz vor der Immobilisierung elektrostatisch aufgeladen wird.

15 145. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 144, *dadurch gekennzeichnet, daß* die pulverisierte Substanz im festen Zustand über dem Träger zerstäubt wird, insbesondere in tiefgefrorener Form.


146. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 145, *dadurch gekennzeichnet, daß* die pulverisierte Substanz im festen Zustand über dem Träger zerstäubt wird und mit einer wieder entfernbaren Abdeckung vor dem Verdunsten oder Sublimieren geschützt wird.

20 147. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 146, *dadurch gekennzeichnet, daß* pulverisierte Substanzen, die unterschiedliche

an den Träger zu koppelnde Moleküle enthalten, im festen Zustand auf den Träger aufgebracht werden.

5  148. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 147, *dadurch gekennzeichnet, daß* pulverisierte Substanzen, die unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle enthalten, im festen Zustand auf eine wieder entfernbare Abdeckung aufgebracht werden und diese Abdeckung auf den Träger gelegt wird.

10 149. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 148, *dadurch gekennzeichnet, daß* nach Anspruch 144 geladene Substanzen dadurch an ausgewählte Teile des Trägers gebunden werden, an denen eine entgegengesetzte Aufladung vorliegt.

15  150. Verfahren nach Anspruch 149, *dadurch gekennzeichnet, daß* die lokale Aufladung bestimmter Teile des Trägers durch Anlegen einer Spannung erfolgt.

15 151. Verfahren nach Anspruch 149, *dadurch gekennzeichnet, daß* die lokale Aufladung ausgewählter Teile des Trägers durch Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen erfolgt.

20 152. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger aufgebrachten Substanzen durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, insbesondere Laserlicht, fixiert werden.

153. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf dem Träger lokal freigesetzten Substanzen durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, insbesondere Laserlicht, fixiert werden.

5 154. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger aufgebrachten Substanzen chemisch fixiert werden.

10 155. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger lokal freigesetzten Substanzen chemisch fixiert werden.

156. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger aufgebrachten Substanzen thermisch fixiert werden.


15 157. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger lokal freigesetzten Substanzen thermisch fixiert werden.


158. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger aufgebrachten Substanzen durch Anlegen einer elektrischen Spannung fixiert werden.



159. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 151, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf dem Träger lokal freigesetzten Substanzen durch Anlegen einer elektrischen Spannung fixiert werden.
- 5 160. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, Alkylierungs-, Biotinylierungs-, Glykosylierungs-Phosphorylierungs- oder Halogenierungsreagentien sind.
- 10 161. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, an Thiole oder die epsilon-Aminogruppen von Lysinen koppeln können.
- 15 162. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, organische Moleküle, insbesondere Heterozyklen, aromatische Gruppen, Aldehydgruppen, Ketogruppen, Imidazolgruppen, Zucker, Lipide, Ester, Phosphatgruppen oder Peptidbindungen enthalten.
- 20 163. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind,

Cofaktoren, insbesondere Häm, Biotin, Coenzym-A, Retinal oder Chlorophyll enthalten.

5  164. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, eine chemische Reaktion, insbesondere eine Additionsreaktion, eine Eliminierungsreaktion, eine Substitutionsreaktion, eine Umlagerungsreaktion oder eine Anlagerungsreaktion mit bereits am Träger gebundenen Substanzen eingehen können.

10  165. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 159, *dadurch gekennzeichnet, daß* die an den Träger zu koppelnden Moleküle, die in der pulverisierten oder immobilisierten Substanz enthalten sind, eine chemische Reaktion, insbesondere eine Additionsreaktion, eine Eliminierungsreaktion, eine Substitutionsreaktion, eine Umlagerungsreaktion oder eine Anlagerungsreaktion anderer Substanzen mit bereits am Träger gebundenen Molekülen katalysieren.

20 166. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 165, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Bereiche auf dem Träger mit elektromagnetischen Wellen, insbesondere Licht, insbesondere mit wiederholbar gepulstem Laserlicht, derart bestrahlt werden, daß die feste Substanz in ausgewählten Bereichen beweglich gemacht wird, wodurch die in der festen Substanz eingeschlossenen Moleküle an den Träger koppeln können.

167. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 166, *dadurch gekennzeichnet, daß* nicht beweglich gemachte, nicht gekoppelte Substanzen mit Lösungsmittel, vorzugsweise erwärmtem Lösungsmittel vom Träger gewaschen werden.

5 168. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 167, *dadurch gekennzeichnet, daß* nicht beweglich gemachte, nicht gekoppelte Substanzen mechanisch, insbesondere mithilfe eines Luftstroms vom Träger entfernt werden.

10 169. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 168, *dadurch gekennzeichnet, daß* die beweglich gemachten Substanzen aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere der D- oder L- Aminosäuren sind.

15 170. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 169, *dadurch gekennzeichnet, daß* die beweglich gemachten Substanzen aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere von natürlichen Aminosäuren oder Multimere natürlicher Aminosäuren sind, die nicht notwendigerweise Bestandteile natürlicher Proteine sein müssen, insbesondere 4-Hydroxyprolin, Hydroxylysin, Desmosin, Isodesmosin, epsilon-N-Methyllysin, epsilon-N-Trimethyllysin, Methylhistidin, Homocystein, Homoserin, Citrullin, Ornithin, Canavanin, Djenkolsäure,  $\beta$ -Cyanoalanin, Cystin, Gluthation.

20

171. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 169, *dadurch gekennzeichnet, daß* die beweglich gemachten Substanzen aktivierte

Monomere, Dimere oder Trimere von künstlichen Aminosäuren sind, die nicht Bestandteile natürlicher Proteine sind.

5 172. Verfahren nach einem der Ansprüche 169 bis 171, *dadurch gekennzeichnet, daß* die aktivierten Aminosäuren oder Aminosäure-derivate nach dem Beweglichmachen mit Standardmethoden an den Träger gekoppelt werden.

173. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 168, *dadurch gekennzeichnet, daß* die aktivierten Monomere, Dimere oder Trimere Nukleoside oder ihre Spiegelbilder sind.

10 174. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 168, *dadurch gekennzeichnet, daß* die aktivierten Monomere, Dimere oder Trimere derivatisierte Nukleoside oder ihre Spiegelbilder sind, insbesondere Vorstufen der Aptamersynthese.

15 175. Verfahren nach Anspruch 174, *dadurch gekennzeichnet, daß* die aktivierten Nukleoside oder derivatisierten Nukleoside nach dem Beweglichmachen mit Standardmethoden an den Träger gekoppelt werden.

20 176. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 175, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Kopplungsreaktionen nacheinander mit verschiedenen oder gleichen weiteren aktivierten Monomeren, Dimeren oder Trimeren, insbesondere mit aktivierten D- oder L-

Aminosäuren oder mit aktivierten Nucleosiden, ihren Derivaten oder ihren Spiegelbildern, durchgeführt werden.

5 177. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 176, *dadurch gekennzeichnet, daß* nach einem ersten Zyklus von Kopplungsreaktionen Schutzgruppen mit Standardmethoden abgespalten werden, wodurch insbesondere freie Aminogruppen oder Hydroxylgruppen entstehen, an die weitere aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere koppeln können.

10 178. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 177, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein oder mehrere weitere Zyklen von Kopplungsreaktionen die an den Träger gebundenen Moleküle um weitere Monomere, Dimere oder Trimere verlängern.

15 179. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 177, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein oder mehrere weitere Zyklen von nicht notwendigerweise identischen Reaktionen die an den Träger gebundenen Moleküle modifizieren.

20 180. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 179, *dadurch gekennzeichnet, daß* nach erfolgter Synthese die Schutzgruppen von den synthetisierten Oligomeren abgespalten werden, wobei die synthetisierten Moleküle an den Träger gebundenen bleiben.

- 5 181. Verfahren nach Anspruch 118, *dadurch gekennzeichnet*, daß vor dem Aufbringen der zu verankernden Molekülen eine bei den jeweiligen Umgebungstemperaturen feste Substanz auf den Träger gebracht wird und daß zur Verankerung der Moleküle diese Substanz geschmolzen wird.
182. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 181, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger eine Compact Disc ist.
- 10 183. Verfahren nach einem der Ansprüche 119 bis 182, *dadurch gekennzeichnet, daß* an dem Träger ein Array von Detektoren und/oder ein Array von Lichtquellen fixiert ist.
- 15 184. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 183, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger in unterschiedliche Bereiche unterteilt wird, insbesondere 20 unterschiedliche Bereiche bei der Peptidsynthese, und daß für jeden dieser Bereiche eine andere Standardsynthese durchgeführt wird, insbesondere eine Standard-Peptid-Synthese mit 20 verschiedenen aktivierten Aminosäurederivaten, die fMoc-Schutzgruppen enthalten.
- 20 185. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 183, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger in unterschiedliche Bereiche unterteilt wird, insbesondere jeweils einen Bereich für jedes eingesetztes Molekül nach einem der Ansprüche 169 bis 172, und daß für jeden dieser Bereiche eine Synthese durchgeführt wird,

insbesondere eine Standard-Peptidsynthese mit weiteren verschiedenen aktivierten Aminosäurederivaten, die fMoc-Schutzgruppen enthalten, wobei die Reihenfolge der Syntheseschritte nicht mit einem bestimmten Typ der Moleküle nach einem der Ansprüche 169 bis 172 beginnen oder enden muß.

5  
10  
186. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 185, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder der in Anspruch 184 genannten unterschiedlichen Bereiche erneut in unterschiedliche Bereiche unterteilt wird, so daß insbesondere 400 unterschiedliche Bereiche bei der Peptidsynthese entstehen, und daß für jeden dieser Bereiche eine andere Standardsynthese durchgeführt wird, insbesondere eine Standard-Peptid-Synthese mit 20 verschiedenen aktivierten Aminosäurederivaten, die fMoc-Schutzgruppen enthalten.

15  
20  
187. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 184, *dadurch gekennzeichnet, daß* jeder der in den Ansprüchen 184 bis 186 genannten unterschiedlichen Bereiche erneut in unterschiedliche Bereiche unterteilt wird, sodaß insbesondere eine Vielzahl unterschiedliche Bereiche bei der Peptidsynthese entstehen, und daß für jeden dieser Bereiche eine andere Standardsynthese durchgeführt wird, insbesondere eine Standard-Peptid-Synthese mit 20 verschiedenen aktivierten Aminosäurederivaten, die fMoc-Schutzgruppen enthalten, oder eine Standardsynthese mit Molekülen nach einer der Ansprüche 169 bis 172.

- 5 188. Verfahren nach einem der Ansprüche 182 bis 187, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Unterteilung des Trägers in unterschiedliche Bereiche, insbesondere jeweils in einen Bereich für jedes eingesetztes Molekül, nach den in einem oder mehreren der Ansprüche 184 bis 187 dargestellten Weise mehrfach wiederholt wird, wobei die Unterteilung nicht notwendigerweise die gleiche Anzahl Bereiche in jedem Schritt enthalten muß.
- 10 189. Verfahren zum lithographischen Aufbringen einer Molekülbibliothek auf einen Träger, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Träger eine Compact Disc verwendet wird.
- 15 190. Verfahren zum lithographischen Aufbringen einer Molekülbibliothek, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger nach einem der Ansprüche 108 bis 115 an einem Array von Mikrolasern fixiert wird.
- 20 191. Verfahren nach 189 oder 190, *dadurch gekennzeichnet, daß* reaktive Gruppen, insbesondere freie Aminogruppen, Carboxylgruppen, Thiolgruppen oder Hydroxylgruppen, mit durch elektromagnetische Wellen abspaltbaren Schutzgruppen abgeblockt werden.
192. Verfahren nach einem der Ansprüche 189 bis 191, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Bereiche mit elektromagnetischen Wellen bestrahlt werden, so daß durch Licht abspaltbare Schutzgruppen abgespalten werden.



193. Verfahren nach einem der Ansprüche 189 oder 190, *dadurch gekennzeichnet, daß* eine für elektromagnetische Wellen empfindliche Schutzschicht auf den Träger aufgebracht wird.
- 5 194. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190 oder 193, *dadurch gekennzeichnet, daß* nach der Bestrahlung von ausgewählten Bereichen des Trägers mit elektromagnetischen Wellen, die für elektromagnetische Wellen empfindliche Schutzschicht an den bestrahlten Bereichen entfernt werden kann.
- 10 195. Verfahren nach Anspruch 189 oder 190, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger an ausgewählten Bereichen durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen, insbesondere von Laserlicht, elektrostatisch aufgeladen oder magnetisiert wird.
- 15 196. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190 oder 195, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger mit elektrisch geladenen oder magnetisierten aktivierten Monomeren, Dimeren oder Trimeren in Kontakt gebracht wird.
- 20 197. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195 oder 196, *dadurch gekennzeichnet, daß* nicht gekoppelte aktivierte Monomere, Dimere oder Trimere weggewaschen werden, erneut ausgewählte Bereiche des Trägers durch das Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen elektrostatisch aufgeladen oder magnetisiert werden und der Träger anschließend mit anderen elektrisch geladenen oder magneti-

sierten aktivierten Monomeren, Dimeren oder Trimeren in Kontakt gebracht wird.

5 198. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195, 196 oder 197, *dadurch gekennzeichnet, daß* der in den Ansprüchen 195 bis 197 beschriebene Vorgang, insbesondere für 20 verschiedene aktivierte Aminosäurenderivate, wiederholt wird, Schutzgruppen abgespalten werden und ein erneuter Syntheszyklus durchgeführt wird.

10 199. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190 oder 195, *dadurch gekennzeichnet, daß* magnetisierte oder elektrisch geladene Substanzen, die unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle enthalten, auf den Träger aufgebracht werden.

15 200. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195 oder 199, *dadurch gekennzeichnet, daß* magnetisierte oder elektrisch geladene Substanzen, die unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle enthalten, auf eine wieder entfernbare Abdeckung aufgebracht werden und diese Abdeckung auf den Träger gelegt wird.

20 201. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195, 199 oder 200, *dadurch gekennzeichnet, daß* unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle zusammen mit magnetisierten oder elektrisch geladenen Substanzen auf den Träger aufgebracht werden.

202. Verfahren nach einem der Ansprüche 189, 190, 195, 199, 200 oder 201, *dadurch gekennzeichnet, daß* unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle zusammen mit magnetisierten oder elektrisch geladenen Substanzen auf eine wieder entfernbare Abdeckung aufgebracht werden und diese Abdeckung auf den Träger gelegt wird.
203. Verfahren nach einem der Ansprüche 189 oder 190, *dadurch gekennzeichnet, daß* unterschiedliche an den Träger zu koppelnde Moleküle mit einem Drucker, insbesondere Tintenstrahldrucker auf den Träger aufgebracht werden.
204. Verfahren nach Anspruch 203, *dadurch gekennzeichnet, daß* die auf den Träger aufgetragenen Substanzen gemäß einem der Ansprüche 152 bis 159 fixiert werden.
205. Verfahren zur Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen (6), insbesondere Laserlicht, auf einen Träger (12), insbesondere auf einen in einem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche verwendbaren Träger, *dadurch gekennzeichnet, daß* ausgewählte Bereiche (7) des Trägers (12) schnell und wiederholbar ortsgenau bestrahlt werden, daß die ausgewählten Bereiche (7) des Trägers (12) mit unterschiedlichen Molekülen (2) oder mit unterschiedlichen Aggregaten an diese Moleküle (4) beladen sind oder beladen werden, daß die unterschiedlichen Moleküle (2) oder die Aggregate an diese Moleküle (4), mit anderen Molekülen (8) in Wechselwirkung treten,

5 daß die auf den ausgewählten Bereichen (7) sich befindenden unterschiedlichen Moleküle (2) oder die Aggregate an diese Moleküle (4) oder die anderen Moleküle (8) mit den eingestrahnten elektromagnetischen Wellen (6) wechselwirken und daß durch die Wechselwirkung der eingestrahnten elektromagnetischen Wellen (6) mit den Molekülen (2) oder mit Aggregaten an diese Moleküle (4) oder mit den anderen Molekülen (8) lokale physikalische Prozesse in Gang gesetzt werden.

10 206. Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger (48) gebundenen Molekülen (50, 52), insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, mit Mitteln, insbesondere wenigstens einem Laser (42, 44), zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen (62) auf den Träger und wenigstens einem Detektor (56, 58) zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen der bestrahlten Moleküle,

15 *dadurch gekennzeichnet,*

- daß die Mittel (42, 44) zum Einstrahlen der Wellen zur Erzeugung kurzzeitiger elektromagnetischer Wellenimpulse ausgebildet sind und
- 20 - daß die Mittel derart mit dem bzw. den Detektor/Detektoren (56, 58) gekoppelt sind, daß der bzw. die Detektor/Detektoren während des Einstrahlens eines Wellenimpulses eventuell erzeugte Lumineszenz-Reaktionen nicht erfaßt.

207. Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger (48) gebundenen Molekülen (50, 52), insbesondere biologischen Molekülen, mit Mitteln, insbesondere wenigstens einem Laser (42, 44), zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen (62) auf den Träger und wenigstens einem Detektor (56, 58) zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen der bestrahlten Moleküle,

*dadurch gekennzeichnet,*

- daß die Mittel (42, 44) zum Einstrahlen der Wellen derart mit dem bzw. den Detektor/Detektoren (56, 58) gekoppelt sind, daß die von den Mitteln erzeugten Wellen (62) zumindest zum überwiegenden Teil von dem bzw. den Detektor/Detektoren (56, 58) nicht erfaßt werden.

208. Vorrichtung zur Erfassung einer Lumineszenz-Reaktion von auf einem Träger (12) gebundenen Molekülen (14), insbesondere biologischen oder biologisch relevanten Molekülen, mit Mitteln, insbesondere wenigstens einem Laser, zum Einstrahlen elektromagnetischer Wellen auf den Träger und wenigstens einem Detektor (28) zur Erfassung eventueller Lumineszenz-Reaktionen der bestrahlten Moleküle, *dadurch gekennzeichnet,*

- daß Mittel zur Bewegung des Trägers relativ zum Detektor und zu den Mitteln zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen derart vorgesehen sind,
- daß mit elektromagnetischen Wellen bestrahlte Bereiche des Trägers nach dem Einstrahlen der Wellen aus dem Einstrahlbe-

reich heraus- und in den Erfassungsbereich des Detektors hineinbewegbar sind.

209. Vorrichtung nach Anspruch 208, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger (14) drehbar gelagert ist.

5 210. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 209, *dadurch gekennzeichnet, daß* zwischen Träger (46) und Detektor (56, 58) wenigstens ein Wellenlängenfilter (60) geschaltet ist.

10 211. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 210, *dadurch gekennzeichnet, daß* zwischen dem Träger und dem Detektor und/oder zwischen dem Träger und der anregenden Lichtquelle wenigstens ein optisches Abbildungssystem vorgesehen ist.

212. Vorrichtung nach Anspruch 211, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens ein Linsensystem oder ein Array aus Linsensystemen umfaßt.

15 213. Vorrichtung nach Anspruch 211 oder 212, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens ein optisches Gitter enthält.

214. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 211 bis 213, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens

einen optischen Spiegel oder ein Array aus optischen Spiegeln aufweist.

215. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 211 bis 214, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem optische Fasern oder ein Array aus optischen Fasern umfaßt.

216. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 211 bis 215, *dadurch gekennzeichnet, daß* das optische Abbildungssystem wenigstens ein Gradienten-Index-Linsensystem (Gradient-index-lens-System) oder ein Array aus Gradienten-Index-Linsensystemen aufweist.

217. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 216, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle verwendet wird, *dadurch gekennzeichnet, daß* Träger und Anregungslichtquelle relativ zueinander fixiert sind.

218. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 217, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle vorgesehen ist, *dadurch gekennzeichnet, daß* als Anregungslichtquelle ein Array von Anregungslichtquellen vorgesehen ist, das an dem Träger fixiert ist.

219. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 218, wobei zum Einstrahlen der elektromagnetischen Wellen wenigstens eine Anregungslichtquelle vorgesehen ist, *dadurch gekennzeichnet, daß*

Träger, Anregungslichtquelle und Detektor relativ zueinander fixiert sind.

220. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 219, *dadurch gekennzeichnet, daß* an dem Träger ein Array von gezielt erregbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, insbesondere ein Array von Mikrolasern oder Leuchtdioden befestigt ist.

221. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 220, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Array (54) von Detektoren (56, 58) vorgesehen ist.

222. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 221, *dadurch gekennzeichnet, daß* Detektoren (56, 58), Träger (48) und Anregungslichtquellen (42, 44) relativ zueinander fixiert sind.

223. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 206 bis 222, *dadurch gekennzeichnet, daß* zur Anregung der Moleküle zwecks Erfassung bestimmter optischer Eigenschaften und als Detektor zur Erfassung dieser Eigenschaften ein Mischarray aus Mikrolasern oder Leuchtdioden und/oder Detektoren vorgesehen ist.

224. Vorrichtung zur Erfassung optischer Eigenschaften von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen, mit Mitteln zum Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen auf



den Träger und einem Detektor zur Beobachtung der bestrahlten Moleküle,

*dadurch gekennzeichnet,*

- daß Mittel zum Ablösen ausgewählter Moleküle vorgesehen sind.

5

225. Vorrichtung nach Anspruch 224, *dadurch gekennzeichnet, daß* ein Detektor zweiter Art vorgesehen ist, mit dem bestimmte Eigenschaften der abgelösten Moleküle erfaßbar sind.

226. Vorrichtung nach Anspruch 225, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Detektor zweiter Art ein Spektrometer, insbesondere ein Massenspektrometer ist.

10

227. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 224 bis 226, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Mittel zum Ablösen einen Laser umfassen.

228. Vorrichtung nach Anspruch 227, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Leistung des Lasers steuerbar ist.

15

229. Träger (12) für Moleküle (14), insbesondere biologische Moleküle, insbesondere zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 205, *dadurch gekennzeichnet,*

- daß der Träger integrierte Positionsmarkierungen (20) aufweist.

20

230. Träger nach Anspruch 229, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Positionsmarkierungen (20) von einem optoelektronischen Abtastsystem erfaßbar sind.
- 5 231. Träger nach Anspruch 230, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger eine im wesentlichen handelsübliche Compact Disc (12), eine Digital Video Disc oder eine Magneto Optical Disc ist.
232. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 231, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Träger lichtdurchlässig ausgebildet ist.
- 10 233. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 232, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Positionsmarkierungen (20) von dem optoelektronischen Abtastsystem eines im wesentlichen handelsüblichen CD-Laufwerks erfaßbar sind.
- 15 234. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 233, *dadurch gekennzeichnet, daß* auf dem Träger eine Peptidbibliothek, insbesondere eine vorzugsweise vollständige 4-, 5-, 6- oder 7mer Peptidbibliothek aufgebracht ist.
- 20 235. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 233, *dadurch gekennzeichnet, daß* auf dem Träger eine Oligonukleotidbibliothek insbesondere eine vorzugsweise vollständige 12-, 13-, 14- oder 15mer Oligonukleotidbibliothek aufgebracht ist.

236. Träger nach einem der Ansprüche 229 bis 233, *dadurch gekennzeichnet, daß* auf dem Träger eine Aptamerbibliothek aufgebracht ist.

5 237. Vorrichtung zum Aufbringen von Molekülen auf eine im wesentlichen ebene Oberfläche eines Trägers, insbesondere eines Trägers nach einem der Ansprüche 229 bis 236,

*umfassend*

- Mittel zur drehbaren Halterung des Trägers um eine zu der genannten Oberfläche des Trägers im wesentlichen senkrechte Drehachse,
- Mittel zum Aufbringen verschiedener Flüssigkeiten, auf die Oberfläche des Trägers im Bereich der Drehachse und
- wenigstens einen relativ zum Träger verfahrbaren Laser zum Bestrahlen ausgewählter Bereiche des Trägers mit Laserlicht.

10  
15 238. Vorrichtung zum Aufbringen von Molekülen auf eine im wesentlichen ebene Oberfläche eines Trägers, insbesondere eines Trägers nach einem der Ansprüche 229 bis 236, *umfassend* düsenartige Mittel zum Aufbringen kleinster Mengen auf dem Träger zu verankernden Moleküle, Mittel zum Verfahren der Mittel zum Aufbringen der Moleküle und des Trägers relativ zueinander und  
20 wenigstens einen Laser zur Bestrahlung ausgewählter Bereiche des Trägers mit Laserlicht.

## Zusammenfassung

Verfahren und Vorrichtungen zur schnellen Erfassung optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten, von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, verbesserte Verfahren und Vorrichtungen zur Erfassung optischer Eigenschaften, insbesondere von Lumineszenz-Reaktionen und Brechungsverhalten von auf einem Träger gebundenen Molekülen, insbesondere biologischen Molekülen anzugeben, die zudem schnell sind und preisgünstig herstell- bzw. durchführbar sind.

Zur Lösung dieser Aufgabe werden verschiedene Verfahren und Vorrichtungen angegeben, wobei unter anderem eine handelsübliche CD (12) als Träger für die zu untersuchenden Moleküle (14) verwendet und das Signal-Rausch-Verhältnis bei Lumineszenz-Reaktionen dadurch verbessert wird, daß anregendes Licht (26) nicht mehr auf ein emittiertes Licht (32) detektierenden Detektor (28) gelangen kann.

Eines der Verfahren benötigt keinerlei relativ zueinander bewegte Teile zur lithographischen Synthese und zum Auslesen von Bindeereignissen an die auf einem Träger aufgebrachte Molekülbibliothek, wodurch die Synthesegenauigkeit, die Auslesegenauigkeit und die Auslesegeschwindigkeit durch die kompakte Bauweise deutlich verbessert werden.



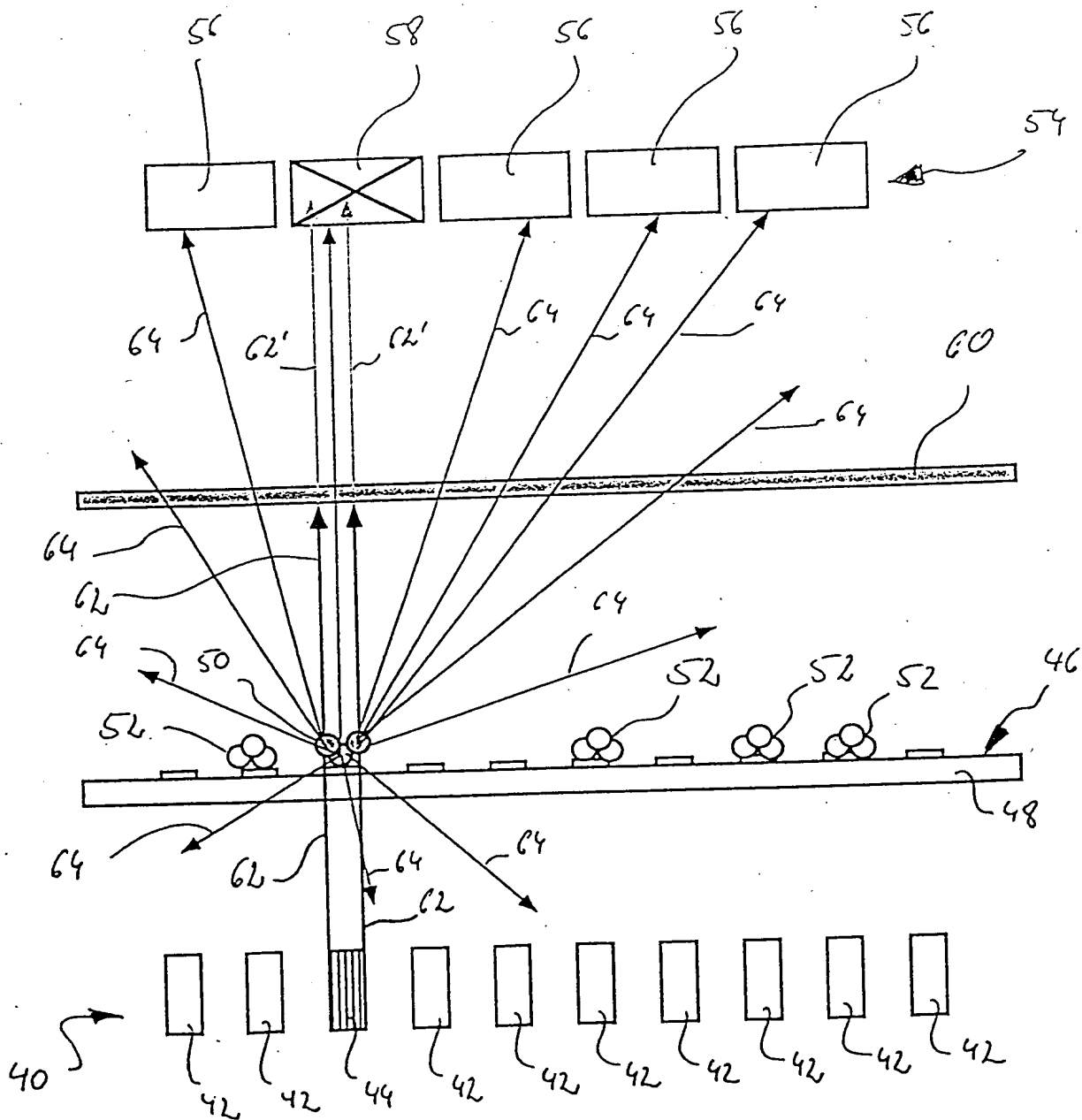


Fig. 2

3/15

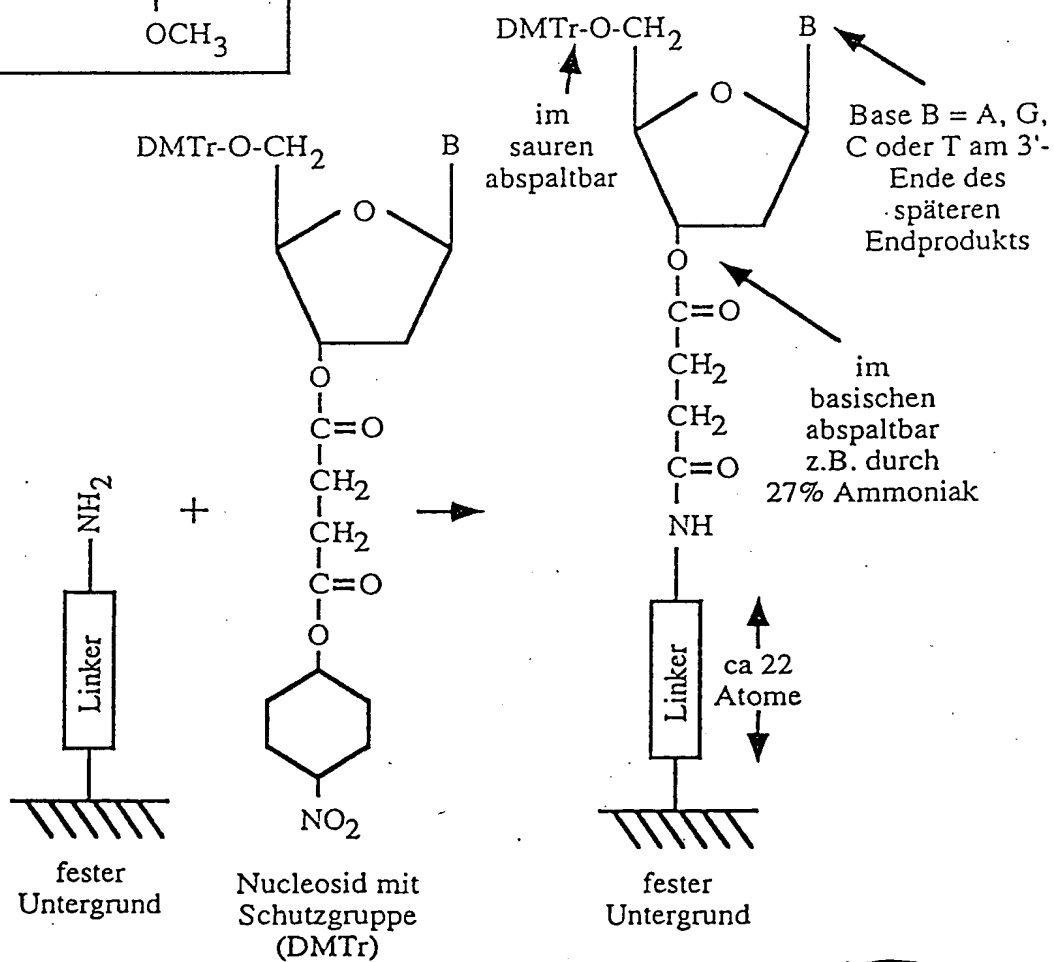
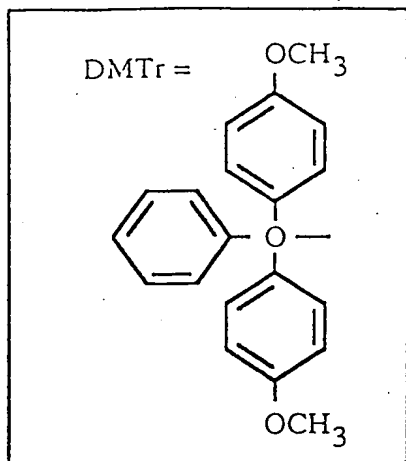
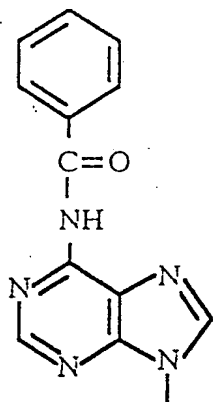


Fig. 3

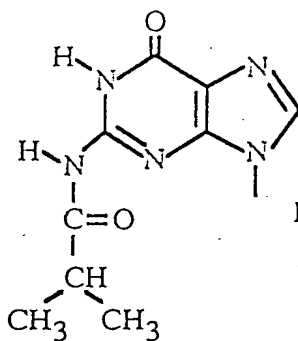
14.12.98

114

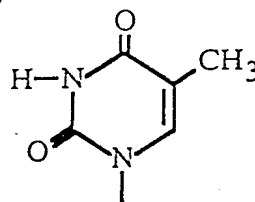
4/15



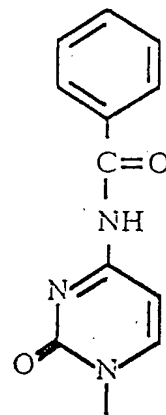
A(Bz) = Adenin  
mit der  
Schutzgruppe  
Benzoyl -



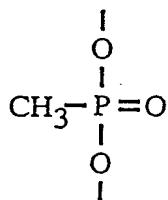
G(Ib) = Guanin  
mit der  
Schutzgruppe  
Isobutyryl -



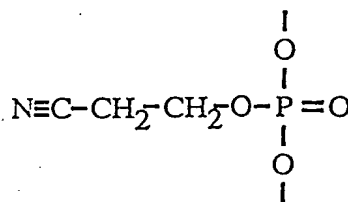
T = Thymin



C(Bz) = Cytosin  
mit der  
Schutzgruppe  
Benzoyl -



Phosphatgruppe  
mit der  
Schutzgruppe  
Methoxy -



Phosphatgruppe  
mit der  
Schutzgruppe  
Beta-cyanoethyl

Fig. 4



14.12.98

115

5/15

5/15

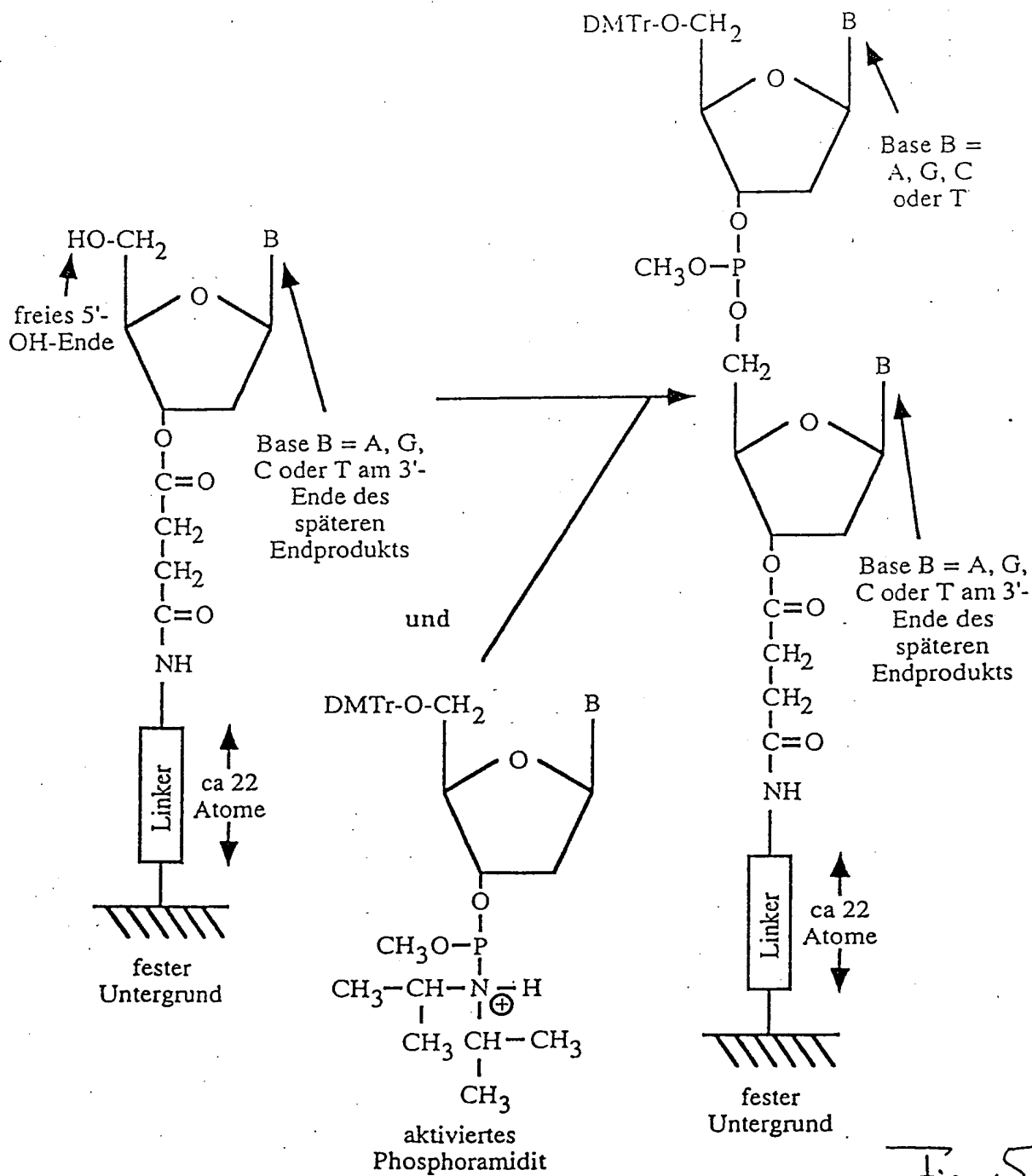


Fig. 5

116

[illegible]

Fig. 6

14.12.98

117

7/15

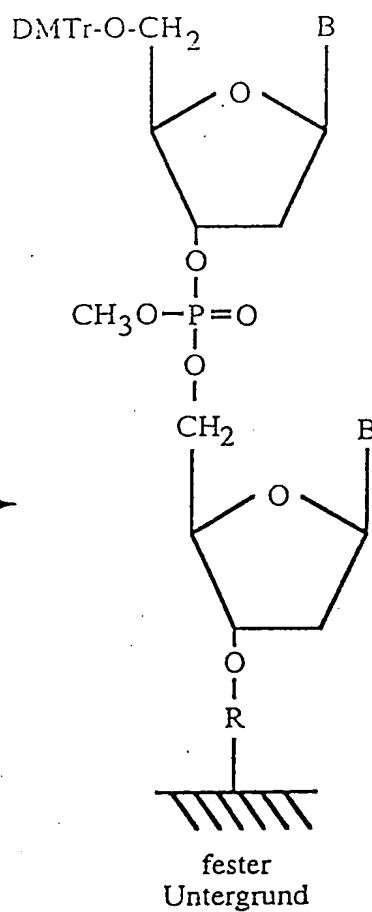
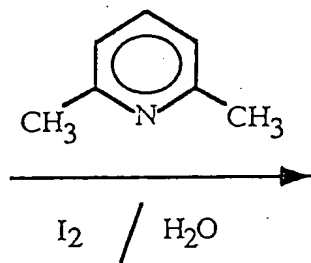
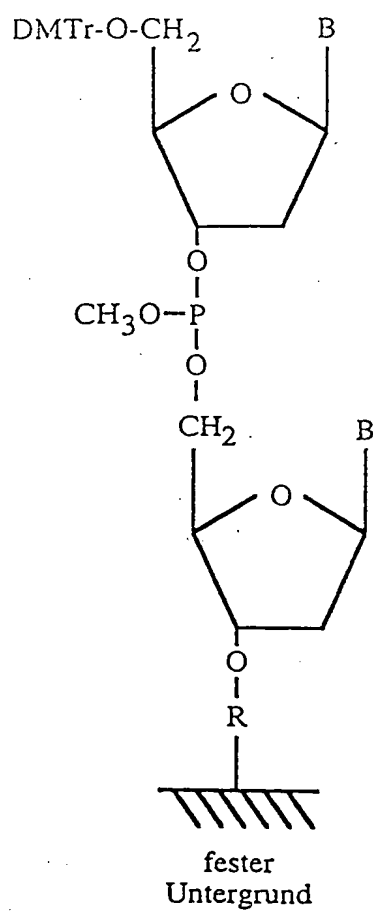


Fig. 7

14-12-98

118

8/15

8/15

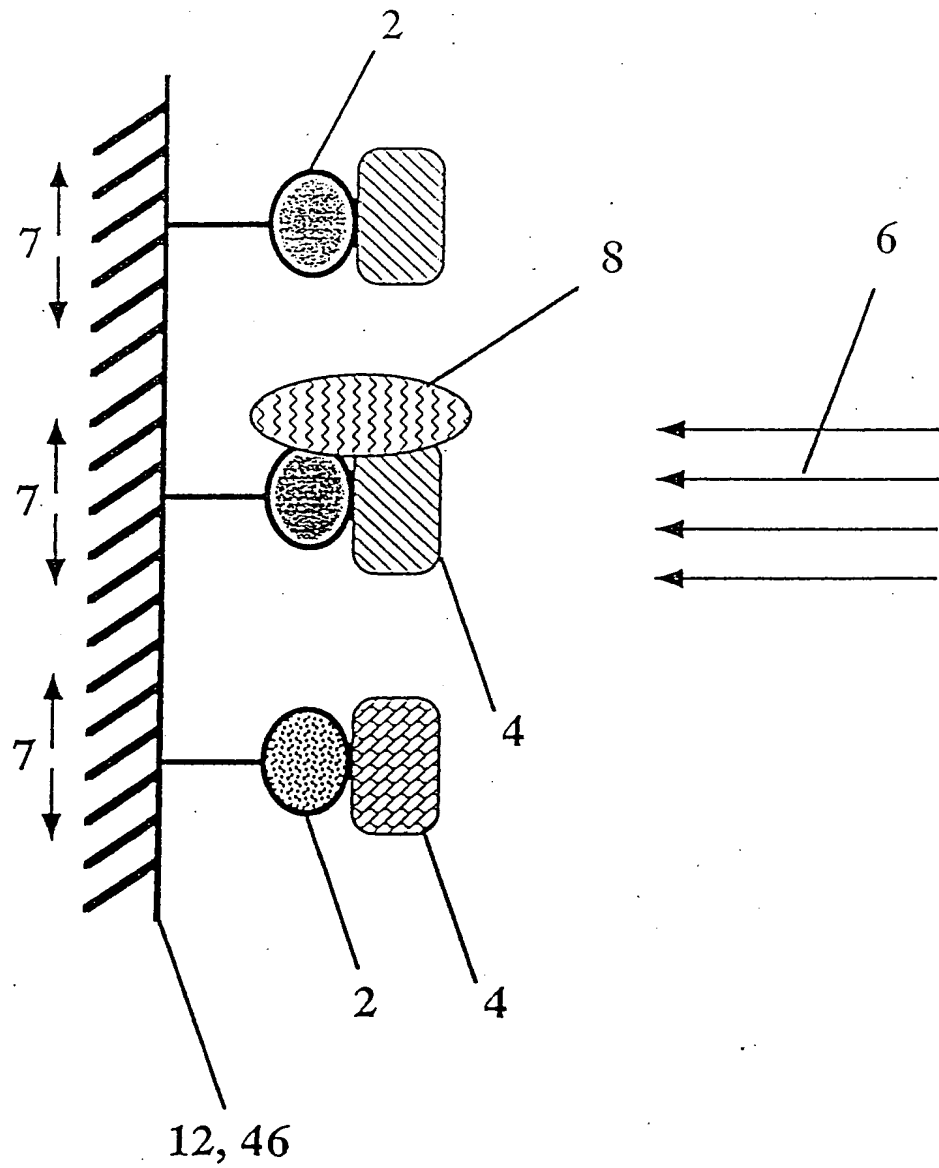


Fig. 8

14-12-98

9/15

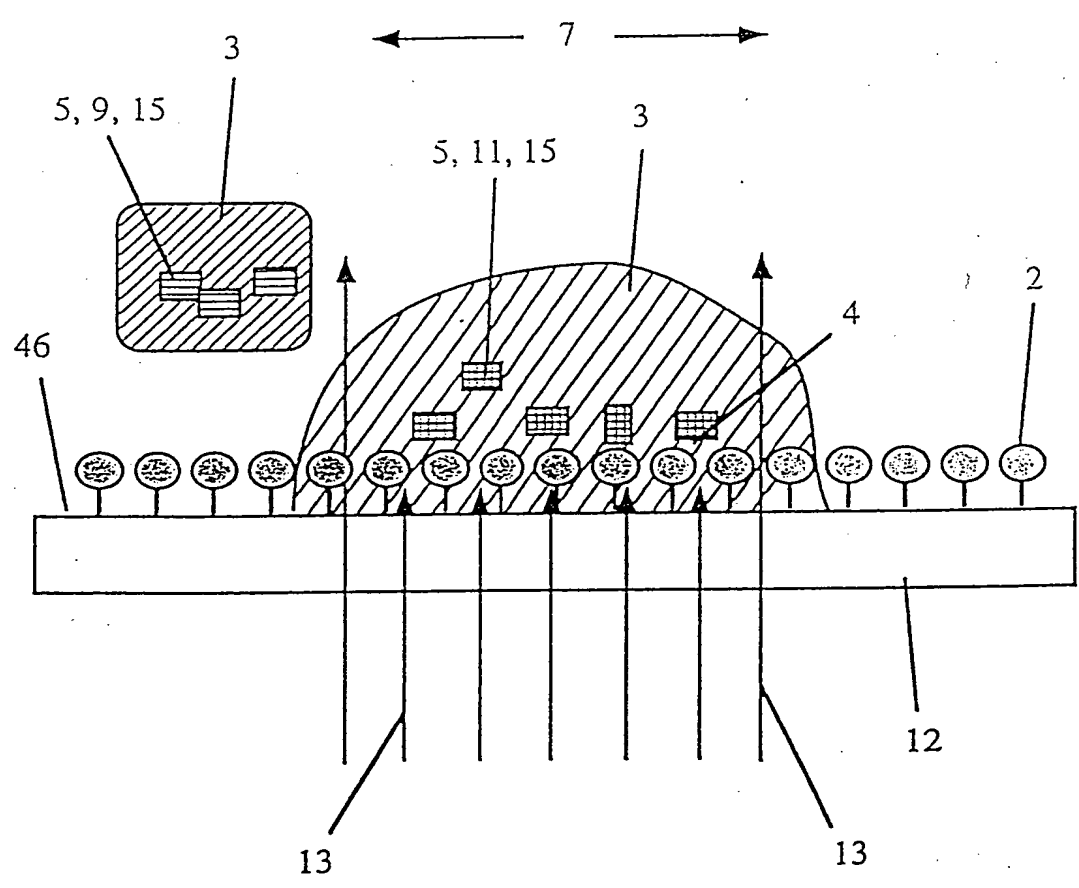


Fig. 9

14 12 98  
10/15

120

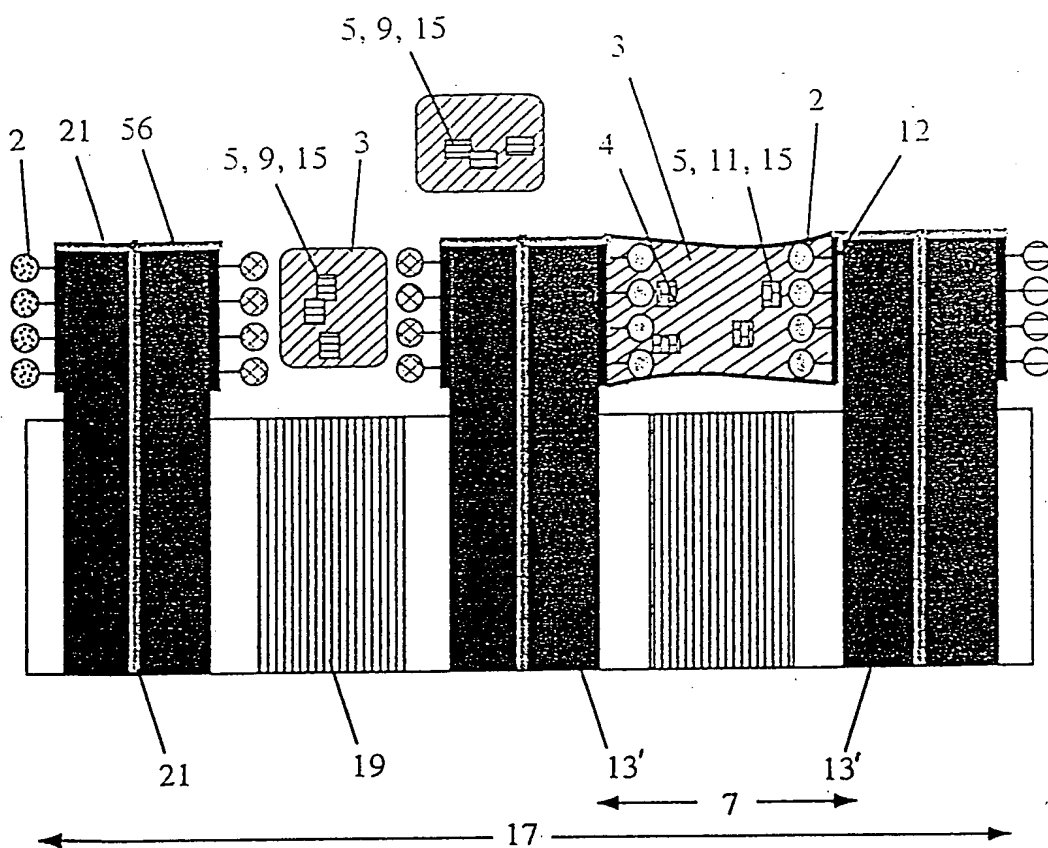


Fig 10

14.12.98

121

11/15

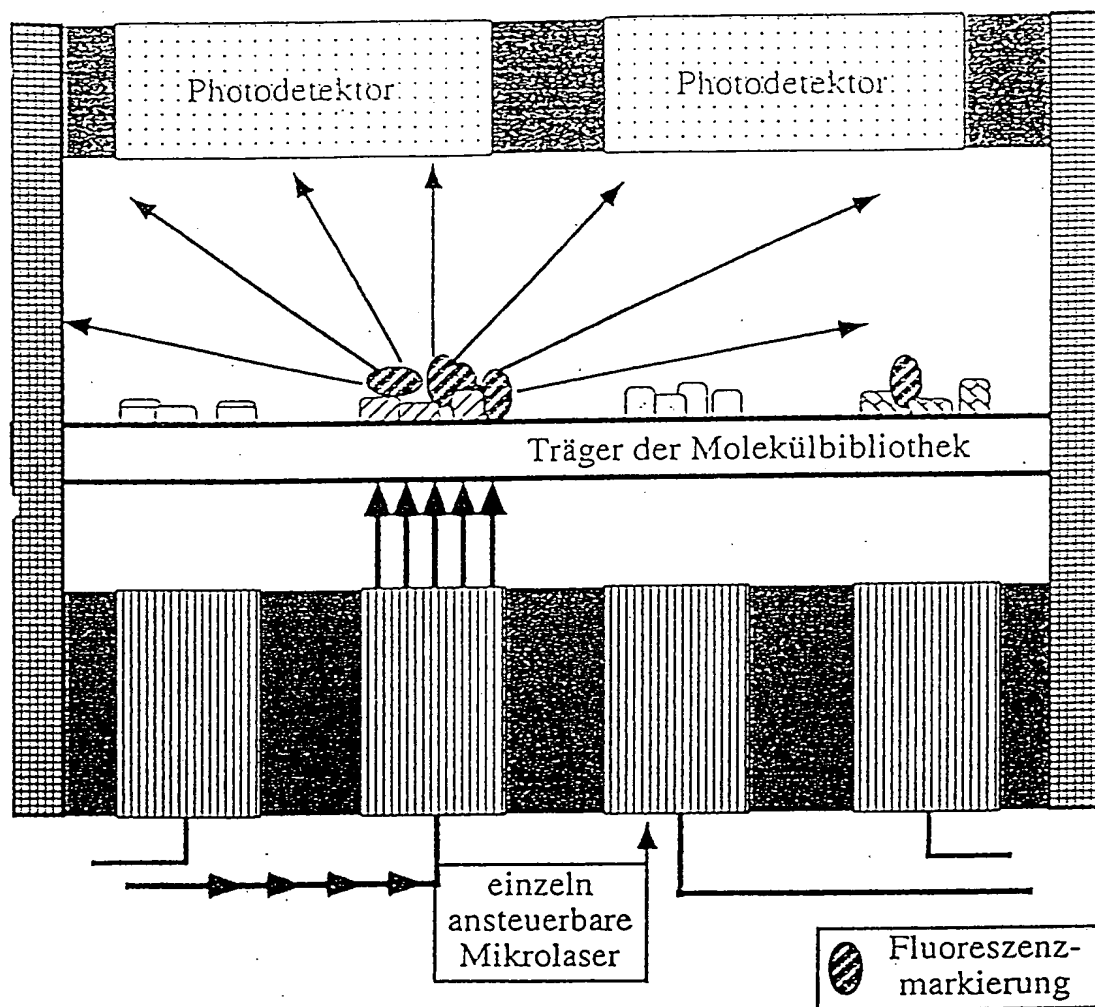


Fig 11

14 12 98

122

12/15

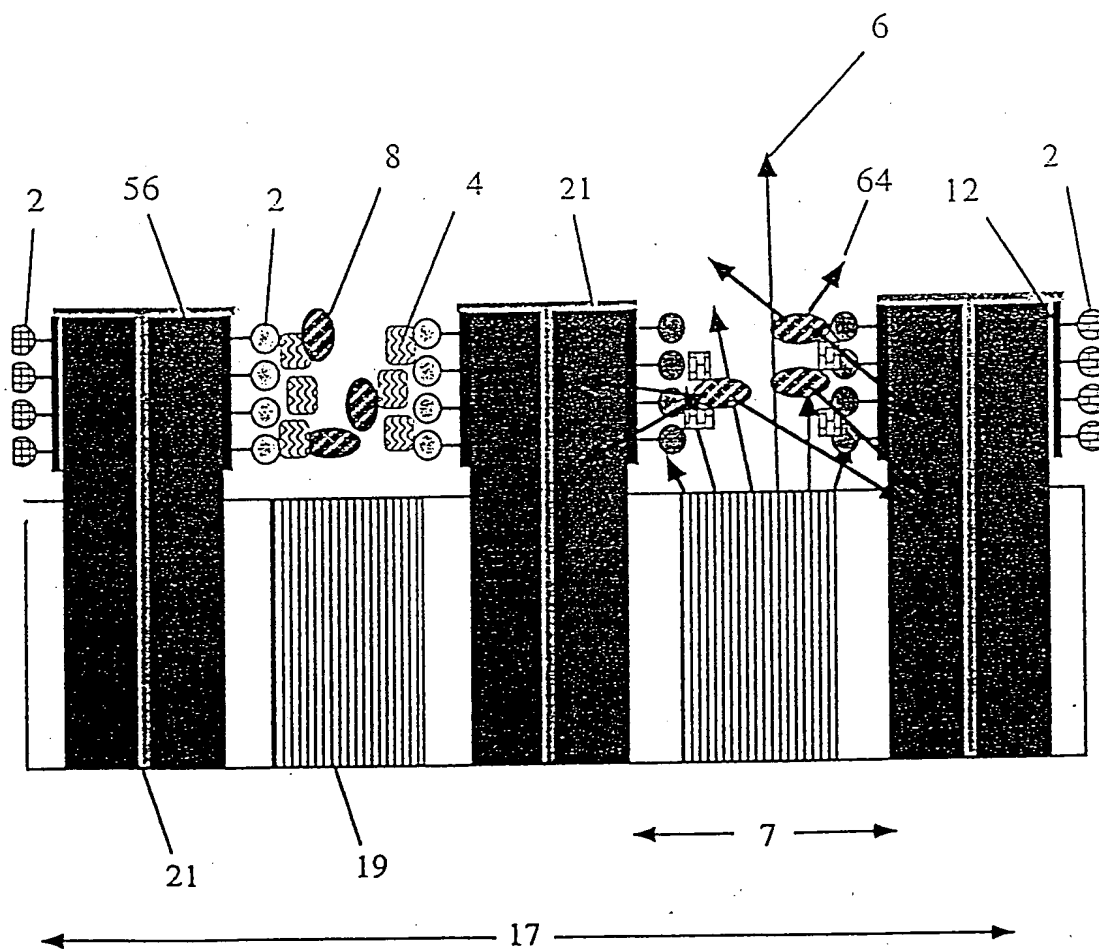


Fig. 12



14.12.98

123

13/15

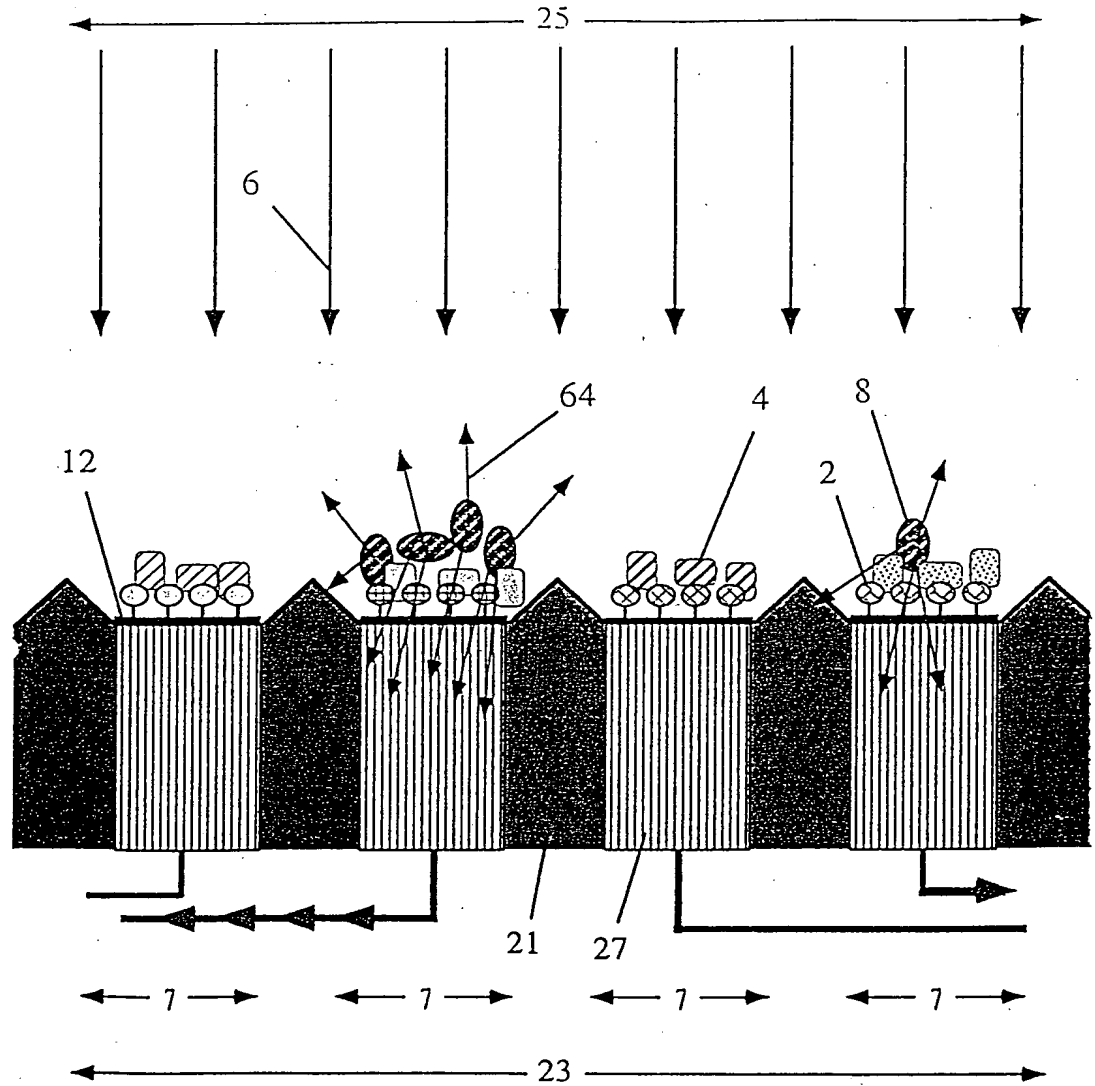


Fig. 13

14-12-90

124

14/15

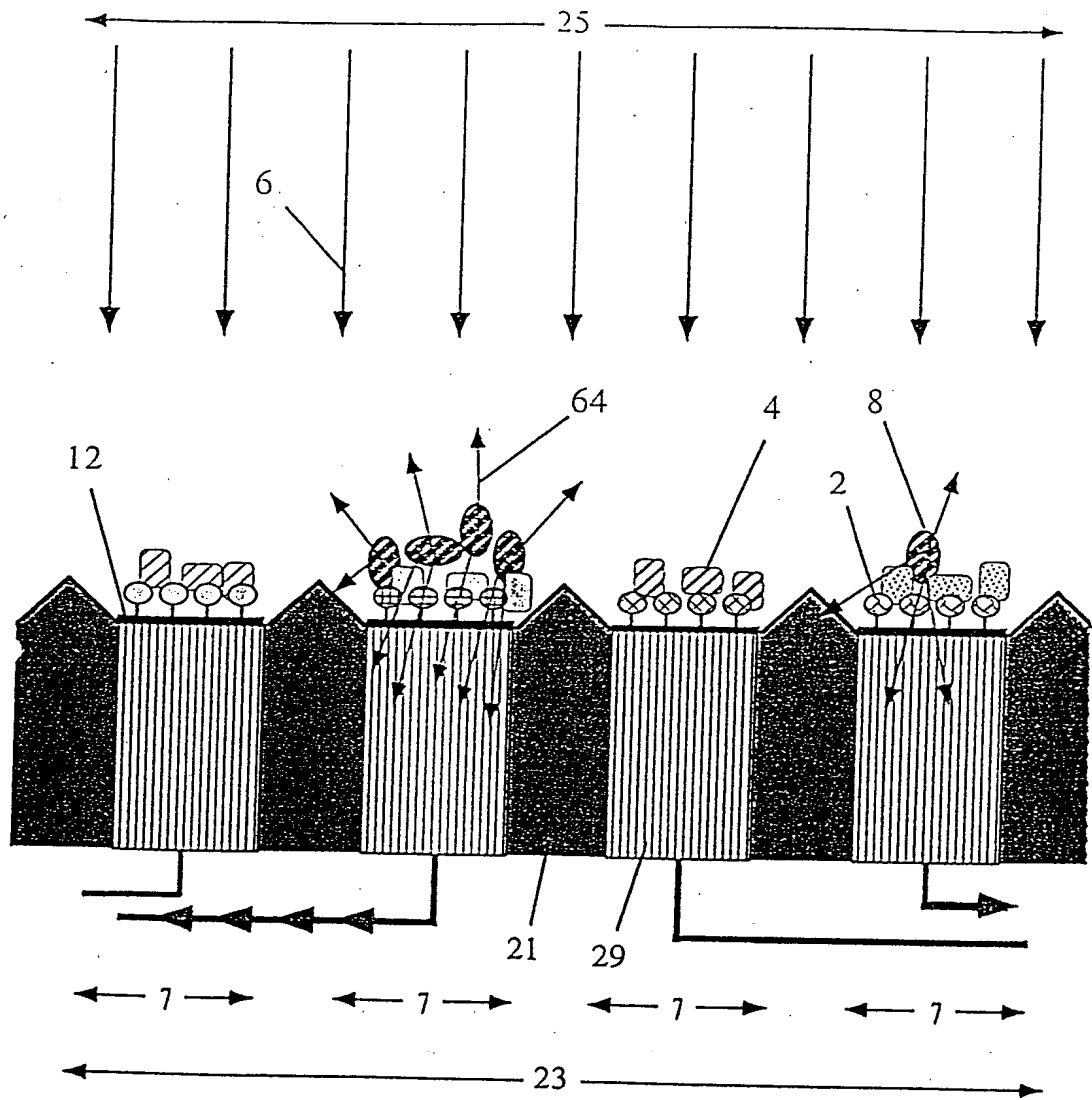
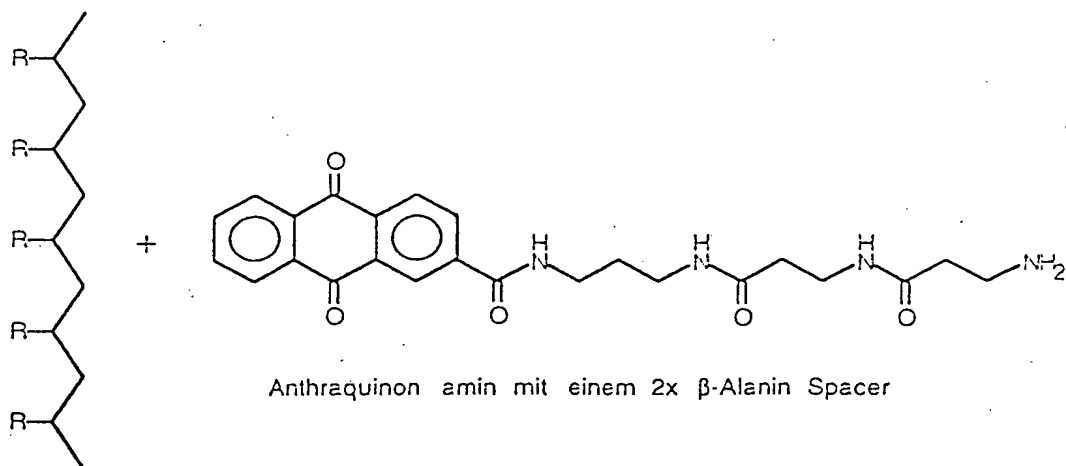


Fig. 14

14.12.98

1/25

15/15



Polystyrol: R =

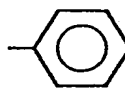
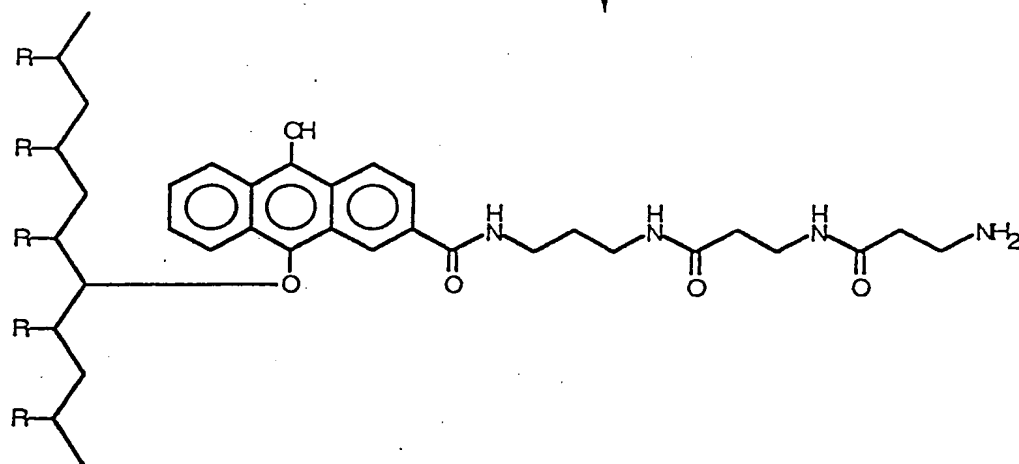
 $h\nu$ 

Fig. 15

# FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

---

---

---

## **Certificate of Priority DE 198 57 529.7 of Filing of a Patent Application**

**File No.:** 198 57 529.7

**Filing date:** December 14, 1998

**Applicant/Owner:** Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung  
des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg/DE

**Title:** Method and apparatus for detecting optical properties, in  
particular of luminescence reactions and refraction  
behaviour, of molecules bound on a support, in particular  
biological molecules

**IPC:** G 01 N 21/63, G 01 N 21/76, G 01 N 21/64,  
C 12 Q 1/00, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/483

**The attached documents are a true and accurate reproduction of the parts of  
the original documents of this patent application filed on December 14, 1998,  
irrespective of possible colour differences due to copying.**

Munich, August 17, 2010  
**German Patent and Trade Mark Office**  
**The President**  
by order

Stichlmair

METHOD AND APPARATUS FOR DETECTING OPTICAL PROPERTIES, IN  
PARTICULAR OF LUMINESCENCE REACTIONS AND REFRACTION  
BEHAVIOUR, OF MOLECULES BOUND ON A SUPPORT, IN PARTICULAR  
BIOLOGICAL MOLECULES

The invention relates to methods and apparatus for detecting optical properties, in particular of luminescence reactions and refraction behaviour, of molecules bound on a support. In this context the term "properties" is understood here in the broadest sense and is intended to comprise not only the properties characteristic of specific molecules such as, for example, their mass spectrogram but for example, also the capability in general, namely by the mere presence, of displaying a certain reaction so that the invention therefore also relates to such methods and apparatus in which initially the mere presence of a substance, but not its type, should be concluded from a specific optical reaction (in which case the type of substance is then determined, for example, from its position on the support). The term "biological" molecules is here taken to mean all types of molecules particularly relevant in biology, pharmacy and medicine, thus for example, peptides, D-peptides, L-peptides and mixtures thereof, naturally occurring oligonucleotides, their mirror images and mixtures thereof, artificially derivatised oligonucleotides, such as those used for construction of aptamers, oligosaccharides and modifications of said molecules. In particular, modular constructed oligomers which do not occur in nature can have particular pharmacological relevance. Particular mention in this connection may be made of non-natural substances produced with the aid of chemical combinatorial analysis which can be used as ligands of biological molecules, in particular organic compounds, steroid derivatives and so on. From a plurality of these molecules, specific binders can be isolated for a naturally occurring molecule which modify the activity of this molecule. However, since these

binders frequently cannot be detached from naturally occurring digestive enzymes, they are especially suitable for use as therapeutics.

Such methods and apparatus are known in various forms but they all exhibit certain disadvantages. Thus the known methods require costly and expensive special equipment for their implementation and are comparatively slow in the readout of a luminescence signal. In particular, if, as is advantageous for different reasons as will be explained subsequently, very many different molecular groups are to be arranged on a common support and investigated singly, very expensive mechanics must be used to activate the individual molecular groups, which is not only expensive and liable to breakdown but also always exhibits manufacturing tolerances in maximum precision work, which are several orders of magnitude higher than the minimum size of the molecular groups sufficient for an investigation. As a result, the maximum number of molecules or molecular groups to be accommodated on a support is limited for known methods and devices and is roughly in the order of magnitude of a few  $10^5$  molecular groups. In particular for certain blood serum or DNA analyses, however, it would be desirable if approximately  $10^8$  to  $10^9$  molecules could be accommodated and studied on one support.

Lithographic methods are known for applying molecules to the appropriate supports, in particular to so-called "diagnostic chips" in which case however, as in the later investigation, the difficulty of exactly assigning molecules and reproducibly purposefully activatable support positions limits the maximum number of molecules which can be applied, since it is not sufficient to arrange very many different molecules closely packed on a support without knowing, however, with reproducible accuracy which molecules are located in which position on the support. In particular, in the known methods and devices, reading out

very many luminescence reactions on a support in a reasonable time and at the same time very accurately is a problem. In the staining investigations which can be carried out advantageously using the methods and devices with which we are concerned here, in which a material to be examined is applied to a support on which different molecules have already been anchored, conclusions should be reached on the substances present in the material to be examined, such as for example specific antibodies in a blood serum, with which the molecules of the material or its constituents anchored on the support have formed bonds so that one must know very accurately which molecule is located where on the support.

Finally in the known apparatus and methods, the molecules, once applied, can usually not be separated at all or only with great effort. In particular, if a very large number of molecules (a "molecule library" is located on the support, which is to be brought into communication with a substance to be investigated or a mixture of substances (a second "molecule library", for example, a protein mixture), it would frequently be desirable to specifically separate from the support the binding partners from the second molecule library, i.e. the molecules that have formed bonds with molecules of the first molecule library and be able to subject these to a further investigation. This would then allow the parallel identification of binding pairs from the two molecule libraries, wherein the binding partner from the first molecule library is in each known by its position of the support whilst the binding partner from the second molecule library can be identified following the specific separation from the support. It would be particularly advantageous in this case if initially those support-bound molecules could be identified which had in general bound molecules from the second molecule library.

On this basis, it is the object of the invention to provide improved methods and apparatus for detecting optical properties, in particular of luminescence reactions and refraction behaviour of molecules bound on a support, in particular biological molecules, which in addition can be produced or carried out cost-effectively. If possible, the methods and apparatus should also be particularly fast to implement or work particularly rapidly.

The object is achieved, on the one hand by a method for detecting a luminescence reaction of molecules bound on a support, wherein electromagnetic waves, in particular laser light, are directed onto the support and substantially only the light possibly emitted by the molecules is detected by the detector. Compared with the known methods which usually operate on the principle of the confocal laser scanning microscope in which some of the scattered exciting light also reaches the detector, this has the advantage that only the emitted light is actually detected and therefore a substantially improved signal-to-noise ratio is achieved. It should be emphasised at this point that the term "light" is understood here to mean all types of electromagnetic waves, in particular therefore also waves having wavelengths outside the sensitivity range of the human eye.

In order to now ensure, without expensive diaphragms or the like, that as far as possible only the emitted light actually reaches the detector or is detected by the detector, on the one hand, the procedure can be adopted that the electromagnetic waves are only briefly directed onto the support, in particular in a pulsed mode, and that the detector does not detect light possibly emitted by the irradiated molecules during the irradiation, wherein the term "detecting" is understood here to mean the determination of a measurable quantity including the generation of corresponding signals which can be used for



the respective investigation, so that light which does not originate from a luminescence reaction may therefore very well reach the actual sensor of the respective detector, as long as it is merely ensured that this light is not converted into perturbing signals, for example by switching off the detection devices downstream of the sensor, in particular therefore the signal generation and evaluation, during the emission of the luminescence-exciting electromagnetic waves.

It should be emphasised at this point that due to the short-term excitation and the time-delayed readout of the luminescence reaction in the dark phases of the excitation, the signal-to-noise ratio can be improved for all types of fluorescence measurements, in particular in fluorescence measurements on the principle of the confocal laser scanning microscope, in the detection of chromatographically separated fluorescence-labelled molecules, in particular in the sequencing of DNA and in fluorescence-activated cell sorters or cell scanners (FACS). Alternatively or additionally to the pulsed emission of the waves, this can be achieved in a particularly advantageous manner by the detector and the support being moved relative to one another after the emission or during the emission of the electromagnetic waves, in particular being rotated relative to one another, so that the molecules irradiated by the electromagnetic waves move in a region which can be detected by the detector. Finally, a plurality of light sources and a plurality of detectors which are alternately switched on and off can also be used so that it is advantageously possible to excite molecules to luminescence in specific regions on the support by irradiating with electromagnetic waves and at the same time or in a time-delayed manner, to detect any luminescence reaction from other, previously excited regions of the support.

Another approach to improve the signal-to-noise ratio of luminescence signals is based on the topography of a mixed array of individually controllable silicon elevations with light-emitting diodes. The individually controllable light-emitting diodes are in this case arranged in recesses so that the light emitted by them only excites a luminescence reaction in adjacent silicon elevations. Naturally, the topography of the mixed array described can be combined with short-term excitation of the luminescence reaction and readout of the signals in the dark phase. Furthermore the short-term excitation of fluorescence molecules also enables a particularly simple assignment of fluorescence signals to individual molecules of a molecule library if these are applied to an array of detectors.

The current produced in the dark phases of the excitation as a result of the luminescence of the molecules can be read out in parallel in the individual photodetectors and thus assigned to the individual members of the molecule library.

A decoupling of excitation and detection is advantageously achieved both by the pulsed irradiation/pulsed detection described and also by the movement of support and detector relative to one another and by the alternate operation of a plurality of light sources and detectors, which leads to a considerably clearer luminescence signal and therefore to an improved signal-to-noise ratio compared with the known methods. The signal-to-noise ratio can be further improved by connecting one or a plurality of wavelength filters between the support and the detector or detectors, which also allows any scattered light of the light used for excitation to be separated from the fluorescence light.

In order to solve this object, a method for detecting optical properties of molecules bound on a support, in particular biological molecules, is provided, wherein

electromagnetic waves are directed onto the support, the irradiated molecules are observed with a detector, selected molecules are automatically separated from the support and supplied to a second detector to detect further, not necessarily optical, properties. This method has the advantage that after a first analysis step (e.g. a staining reaction known per se), in which specific molecules have formed bonds with molecules already previously bound on the support and have thus formed new molecule complexes, these new molecule complexes can be specifically further investigated, in which case, for example, a mass spectrum of the separated molecule complexes can be produced by the second detector.

In this case, it is possible to proceed such that the selected molecules are separated from the support by irradiation with electromagnetic waves, in particular by irradiation with laser light, which can be implemented relatively simply and cost-effectively for a very large number of samples.

In a particularly advantageous manner, a mixed array of individually controllable silicon elevations and light-emitting diodes can be used to separate selected molecules. The individually controllable light-emitting diodes in this case serve to excite adjacent fluorescence-labelled molecules and with the identification of binding events to pre-select which molecules should be separated from the support and supplied to a second detector. If these molecules are situated on individually controllable silicon elevations, these can be very easily separated from the support, for example, by applying an electrical voltage.

Thus, for example, in the mass spectrometer the initially unknown binding partner from a second molecule library can be determined at a member from the first molecule library already known through the position on the support, and

specifically for a plurality of members in parallel. The identity of the binding partner from the second molecule library is obtained, for example, by comparing the mass (or tryptic fragments of a bound protein) with the known sequences from an already sequenced genome. Another example is the separation of a recombinant phase antibody which has bound a known antigen by its surface-expressed Fv antibody. An E. coli bacterium can be infected with this phage antibody and the recombinant antibody can then be produced.

Another example is the sequencing of complex DNA by means of solid-phase-linked oligos in which a sequencing reaction takes place "in situ", i.e. in parallel in millions of different oligos. The oligo originally linked to the support is modified, it being extended with the aid of a polymerase and a template until a ddNTP incorporated by the polymerase leads to a chain termination. Instead of the originally linked oligos, a family of somewhat longer oligos is obtained, for example, terminated by a ddC. This family of modified oligos must be separated from the template (e.g. by heating) and then from the support (for example, by incorporating an S=S bridge in the connecting piece to the support which can be cleaved with the aid of reducing agents such as mercaptoethanol). The mass spectrometer then determines the masses of the individual members of this family of ddC terminated oligos and by comparison with the predicted masses, the sequence of the extension.

The said object is further achieved by a method of the type specified initially using a support having integrated position markings which are as fine-meshed as possible and can be detected by a detector. Compared with the known methods, this has the major advantage that any inaccuracies in the respective process mechanism no longer need to result in incorrect investigation results since the position markings integrated in the support make it

possible to check the actual position of the support relative to a detector. In this case, a substantially commercially available compact disk (CD), a digital video disk (DVD) or magneto-optical disk (MOD) can particularly advantageously be used as supports which already have fine-meshed internal position markings, which allows a precise determination of position on micrometers, the methods for reading and checking the markings on these known supports having already been successfully used. As a result of similarity of CD, DVD and MOD in relation to the properties required here, subsequently for simplicity, only CDs are mentioned although this is always intended to include DVD and MOD.

The CDs and read-out devices which can be used in the method according to the invention are also significantly more favourably priced than the known diagnostic chips.

It is particularly advantageous to use a transparent compact disk in the method described above. This specifically allows laser light used in a manner known per se for scanning the position markings to be used simultaneously to excite luminescence reactions. Alternatively, a CD with a wavelength filter integrated in the CD can be used, whereby a laser can be used for the exact fine-meshed determination of position using a technique known per se, the laser light not reaching the molecules applied or to be applied to the other side of the CD. Another laser whose light can pass through the said wavelength filter can then be used for the synthesis or readout of the luminescence reaction. This second laser is fixed on the first laser so that with the determination of the position of the first laser, the positioning of the second laser beam on the CD is also known.

The flat screens used in computers also have integrated position markings in such a manner that the individual

LED/LCD pixels are assigned to very precisely determined positions and are individually controllable so that a transparent support for biological materials attached in the immediate vicinity above the light-emitting diodes/liquid crystals can be illuminated at precisely defined points. This applies all the more if the liquid crystals used hitherto are replaced by an array of miniaturised lasers or light-emitting diodes packed as closely as possible.

A particularly advantageous solution is based on the topography of a mixed array of individually controllable silicon elevations with the molecules applied thereon with light-emitting diodes. The individually controllable light-emitting diodes are in this case disposed in recesses so that light emitted by them only excites a luminescence reaction at adjacent silicon elevations. A reproducible exact assignment of excitation light and applied molecules is thereby possible.

The use of an array of microlasers or light-emitting diodes or the use of the said mixed array affords the possibility of keeping the support of the biological materials fixed above the array during a complete cycle, starting from the synthesis of the molecule library, which is preferably lithographic or mediated by the application of a voltage, through the staining of the library with a second molecule library as far as reading out the binding events. This ensures a very simple, very rapid and nevertheless reproducibly extremely exact triggering of the individual pixels, in which case the time-consuming triggering and focusing of the individual pixels is omitted. The possibility of imaging the array of light-emitting diodes or microlasers with the aid of a simple imaging systems on the support in scaled-down form also allows a very high packing density of the molecule libraries applied by

lithographic syntheses. In addition, support and array and then be separated, whereupon the array can be re-used.

For example, arrays of photomultipliers, PIN diodes, avalanche diodes or a so-called multi-channel plate can be used as detectors. The detectors can also be embedded directly in the arrays of excitation light sources, thereby forming mixed arrays of detectors and excitation light sources.

If the molecules to be investigated are applied to one side and the position markings are applied to the other side of the compact disk, this allows the number of molecules which can be arranged per unit surface area on the support in a precisely defined and in particular re-locatable position to be vastly increased compared with the known methods - hitherto about  $10^5$  molecules could thus be arranged on a support of comparable size to the size of a CD such that their exact position could be exactly determined, whereas now  $10^8$  to  $10^{10}$  molecules can be arranged on a CD, exactly located and specifically investigated. The same applies when using a type of flat screen, particularly when the hitherto usual liquid crystals are replaced by an array of microlasers or light-emitting diodes. The exact position information is obtained in this case by the relative arrangement of the microlasers with respect to one another, so that precisely defined points can be illuminated on a preferably transparent support of molecule libraries arranged parallel above the flat screen. It is therefore possible for the first time to arrange very large molecule libraries on a single, very handy support. For example, a preferably complete peptide library, in particular a 4-, 5-, 6- or 7mer peptide library can be applied to the support, in which case, after application of the peptide library, the support can be brought in contact, for example, with a blood serum to be investigated. It is likewise possible to apply a preferably complete

oligonucleotide library to the support, in particular a 15mer oligonucleotide library, in which case after application of the oligonucleotide library, the support can be brought in contact with DNA to be investigated, in particular fluorescence-labelled and multiplied with the aid of random oligonucleotide primers. It is thereby possible for the first time to test a blood serum or DNA sample for very many infectious, autoimmune or hereditary diseases in a single staining reaction, wherein the detection of any serum antibodies bound to molecules of the peptide library can be accomplished in a manner known per se by fluorescence-labelled anti-human antibodies.

The invention thus creates completely new diagnostic possibilities and in particular increases the chances of finding diagnostic markers and therapeutics. If, for example, complete 6mer peptide libraries are brought into communication with a fairly large number of patient sera and for example, studied by means of a staining reaction to determine to which peptides component parts of the sera had attached, correlations will then be found between disease and stained peptides. This is down to the fact that each person carries with him a very complex individual pattern of antibody reactivities in his blood serum, which in particular reflects the battle of his immune system with acute, chronic, hidden or already-survived diseases. A large proportion of the antibody reactivities can be defined by the specific binding to penta- or hexapeptides with the result that when analysing the binding reactivities to a complete penta- or hexapeptide library, the aforesaid individual pattern of antibody reactivities can be determined in hitherto unknown complexity. Longer binding motifs, in particular those likewise occurring frequently having a helical structure, can be determined by libraries in which not every amino acid is random but only those at specific positions derived from the structure. Hence, new diagnostic markers and hitherto unknown



correlations between disease and specific antibody reactivities can be found, including, for example, markers for tumour diseases, for cardiovascular diseases such as heart attack, for multiple sclerosis and Parkinson's disease, for all types of autoimmune diseases and allergies and for all types of infectious diseases.

The ensuing pattern of markers on the one hand allows diagnostic prediction by the correlation with specific disease pictures. However, the newly found markers can also be applied separately to supports and used in future investigations. Similarly, attempts can also be made to correlate diseases with binding patterns to other molecule libraries, such as D peptide libraries or oligonucleotide libraries. At the same time, this method is not restricted to human diseases but is also suitable for investigating forensic and veterinary medical questions as well as for analysing other fluids, from plant extracts to extracts from micro-organisms.

In a further application, molecules of potentially therapeutic interest such as, for example, D-peptides which cannot be degraded by human digestive enzymes are disposed on a support and subsequently brought into contact with medically relevant molecules, in particular with pathogen-specific proteins or with mixtures of pathogen-specific proteins. This makes it possible to specifically and rapidly search for binding partners to these medically relevant molecules. Similarly, the search for enzyme ligands, enzyme substrate analogues or enzyme inhibitors is possible.

The binding to the medically relevant molecules can then be detected, e.g. by way of biotinylation or fluorescence labelling so that it is possible to identify the D peptides or aptamers which bind at least parts of the pathogen. These D peptides or aptamers can then be successively

tested as to whether they inhibit the pathogen. If, for example, an enzyme of the pathogen (e.g. protease of HIV, reverse transcriptase etc.) is present in a suitable quantity, this enzyme can be fluorescence-labelled (either directly or by recombinant expression of a small peptide tag which can be stained with the aid of a monoclonal antibody. It can thus be determined to which D-peptide the enzyme has bound. A further staining reaction induced by the enzyme activity is then carried out. For example, the cleavage by the HIV peptide precipitates a fluorescent peptide which can be detected. Thus, D peptides are obtained which not only bind the enzyme but at the same time inhibit it.

In order to determine to which of the molecules bound on the support, molecules have attached, after or before bringing in contact the support with the blood serum or the DNA, the blood serum or the DNA can be brought in contact with a substance which reacts with the blood serum or the DNA, in particular forms bonds therewith. Expediently in this case, before bringing in contact with the serum or the DNA, the substance reacting with the blood serum or the DNA is stained with a substance that can be excited to luminescence, in particular a substance which can be excited to fluorescence by irradiation with laser light. Such dyes are available commercially, for example, under the name "Cy3", "Cy5", "FITC" or "TRITC", a whole range of conjugates of these fluorescence dyes advantageously being available (e.g. goat anti-human antibody conjugated Cy5).

If the blood serum to be studied is brought in contact with a specific detection reagent for type E immunoglobulins, any allergies existing in the patient can thus be determined since the type E immunoglobulins are responsible for the allergic reactions such as asthma and hay fever. Non-allergy sufferers have almost no IgEs in their blood serum whilst allergy sufferers have different amounts which

can reveal different allergens. Finally, the invention makes it possible to search for specific binding partners for a target molecule from a library of  $10^8$  to  $10^{10}$  different molecules and thereby, by simultaneously identifying many (variously strongly binding) binding partners, search for the structure parameters responsible for the binding of the ligand to the target molecules. As a result, the path to lead structures is highly simplified. For example, signal patterns obtained for this with the aforesaid methods can be automatically correlated with structure parameters or structure parameters of the identified ligands from the libraries used.

In order to now arrange a peptide library on a support, in particular on a support which can be used in one of the methods just described, the surface of the support can be initially coated with a plastic layer containing free amino groups for the solid phase synthesis of a peptide or oligonucleotide library (e.g. the derivatised polystyrene "CovaLink" from Nunc) (for the introduction of primary amino groups into polystyrene see Fig. 15). After inserting a suitable spacer, the free amino groups are then blocked with a light-cleavable protective group. One example out of many for an activated, i.e. reactive with amino acids, light-cleavable protective group is nitroveratryloxycarbonyl (NVOC).

Protective groups in specific regions of the support are then cleaved by means of a laser, whereupon an activated amino acid whose own amino group is blocked by a light-cleavable protective group is applied to the support and distributed there so that the amino acid can link to the free amino groups. The process steps "cleaving of protective groups in specific regions of the support" and "supplying an activated amino acid whose own amino groups is blocked by the light-cleavable protective group" are then repeated for different, preferably all 20 amino acids

and finally the protective groups of all synthesized peptides are cleaved.

Alternatively, a different lithographic method can also be used for applying a peptide library. For example, the well-established conventional usual standard syntheses (e.g. use of fMoc protective groups in the peptide synthesis) can be combined with an inclusion of the activated monomers in photo- or electrolabile larger particles. The emitted electromagnetic waves or an applied voltage then does not cleave the photo- or electrolabile protective group on the growing oligomer, but only releases the normal activated monomers such as are used for the standard syntheses. In this case, the activated monomers are preferably dissolved at higher temperature in a solvent whose melting point or transition into a gel-like state lies near 20 °C, whereupon a laser light-absorbing dye is added, the mixture is cooled and is pulverised at low temperature into small solid particles which are nebulised above the support for the lithographically synthesised molecule libraries. The activated monomers are only released locally from these particles where a laser heats the particles as a result of the absorption of the included dye. As a result, the particles liquefy or gel and the activated monomers in solution can link to the free amino groups (or as in the oligonucleotide synthesis, to free hydroxyl groups). The liquid solidifies again directly adjacent to the heated location.

In this case, the heating of the solid particles takes place advantageously with the aid of a repeatedly briefly emitting light source, in particular a laser or a light-emitting diode, with the result that particularly sharply defined transitions are formed between solid particles and substances released locally from the particles.

Alternatively to fusing particles, a cage inclusion, in particular in fullerenes, or another method for release can be used, which can be triggered, for example, by electromagnetic waves or an electrical voltage.

Furthermore, selected regions can alternatively also be heated by the application of a voltage repeated in quick succession, in particular if a mixed array of individually controllable silicon elevations with light-emitting diodes is used. Instead of activated monomers, combinations of monomers can also be linked, i.e. for example all 20 x 20 possible activated dimers of L amino acids.

In the next step the non-linked monomers, the non-disintegrated particles and/or the solidified particles are either simply blown away or dissolved and washed away, solid particles containing activated monomers are applied anew, linked to the support in selected regions and this step is carried out successively with preferably all the available different activated monomers, the standard protective groups newly introduced as a result of the links which have been made are cleaved by known techniques and the next cycle is commenced until, for example, a complete peptide library has been synthesised. Additional modifications of a different type by other chemical reactions are also possible, in particular, biologically relevant modifications such as glycosylations, phosphorylations or alkylations.

Another possibility when using a mixed array of individually controllable silicon elevations with light-emitting diodes is the control of the combinatorial molecular synthesis by applying a voltage in selected regions. As a result, correspondingly charged activated monomers for the molecular synthesis are either repelled or attracted on selected regions.

For application of an oligonucleotide library onto one of the aforesaid supports, it is possible to proceed similarly to the synthesis of the peptide library with the difference that instead of the 20 different activated amino acids, only four different activated nucleotides are used. In a suitable manner four different 3'-O-phosphoramidite-activated deoxynucleosides are used for this purpose, having a photolabile protective group at the 5' end or at the 3' end or which, as described for the synthesis of a peptide library, are nebulised over the carrier included in particles and then made mobile by the irradiation with electromagnetic waves. The free hydroxyl groups usually used for the oligonucleotide synthesis can be introduced at the same time with the insertion of a suitable spacer.

Similar methods can also be used for the production of aptamer libraries, i.e. for oligomers based on ribonucleotides and their derivatives. In addition, reactive molecules of different types such as are used, for example, in combinatorial chemistry, can also be included in the activatable particles and released in a locally specific manner. Consequently, in addition to nucleotides or amino acids, numerous other groups can also be used as monomeric combinable building blocks for oligomer synthesis.

Alternatively, a molecule library can also be applied to the support by one of numerous printing or spotting methods such as are used, for example, by means of a nozzle, similarly as in an ink jet printer. Selected regions of the support can then be irradiated with laser light or with the aid of light-emitting diodes in such a manner that this results in anchoring of the applied molecules on the support in these regions. This is particularly advantageous because a luminescence signal is thereby subsequently excited and read out in precisely the same region in which

the applied molecules had been previously anchored as a result of the activity of the exciting laser.

In order to achieve this, for example, before applying the molecules to be anchored, a substance which is solid at the respective ambient temperatures can be applied to the support, which substance is then fused to anchor the molecules. In this case, it is possible to proceed so that the surface of a support (e.g. due to the uniform chemical linking of streptavidin or biotin on the entire support) is activated, then at 40 °C a solvent containing dye molecules which are solid at 10 °C (possibly hydrophobic, if hydrophilic molecules are to be linked) is applied to the support and is left to solidify there, whereupon the molecules to be linked to the support are then applied, selected regions of the support are heated by means of laser, light-emitting diodes or voltage with the result that the solvent liquefies or locally volatilises and can bind the applied molecule to be linked to the support. The binding preferably takes place via biotin-streptavidin. Non-bound molecules are then washed away and the cycle can begin with a new spotting or printing process until finally a close-packed and complex molecule library is applied to the support.

However, the application or the synthesis of a molecule library on a support is not restricted to the methods described; as further methods, mention may be made, for example, of:

- the spotting of micro-quantities of molecules with the aid of a principle comparable to the fountain-pen, in particular of PCR products of multiplied gene sequences;
- the spotting of micro-quantities with the aid of a type of screen printing method, in particular of

activated monomers for oligonucleotide synthesis, the synthesis of peptides or the synthesis of PNAs;

- the spotting of micro-quantities with the aid of a type of ink jet printer, in particular of activated monomers for oligonucleotide synthesis, the synthesis of peptides or the synthesis of PNAs;
- the synthesis of PNAs, wherein at each point of the polymerisation cycles or after imprinting the molecules, other compounds can be appended or the already-linked molecules can be modified.

In an apparatus suitable for solving the object specified initially, for detecting a luminescence reaction of molecules bound on a support, in particular biological molecules, means are provided, in particular a laser for directing electromagnetic waves onto the support and a detector for detecting any luminescence reactions of the irradiated molecules, wherein the means for directing the waves are configured to produce short electromagnetic wave pulses and are coupled to the detector in such a manner that the detector does not detect any luminescence reactions produced during the emission of a wave pulse

Alternatively or additionally, for solving this object, in an apparatus of the type specified initially, it is also possible to provide means for moving the support relative to the detector and to the means for directing the electromagnetic waves in such a manner that regions of the support irradiated by electromagnetic waves can be moved out of and into the detection range of the detector after the irradiation by the waves, wherein the support is preferably rotatably mounted.

A particularly advantageous embodiment in this case is based on the topography of a mixed array of individually



controllable silicon elevations with the molecules applied thereon, with light-emitting diodes. The individually controllable light-emitting diodes are in this case arranged in recesses so that the light emitted by them only excites a luminescence reaction at adjacent silicon elevations. An exact, in particular short-term excitation of a selected region is thereby possible in a reproducibly detectable manner. This embodiment even affords the possibility of assigning a voltage change produced by the luminescence signal directly to each individual silicon elevation so that in this case, the support of the molecules is identical to the detector.

Furthermore, as a result of the short-term excitation of fluorescence molecules, the specific luminescence excitation of selected regions can be dispensed with if the different molecules of a molecule library are applied to an array of detectors. In this case, the excitation can preferably be accomplished by a pulsed laser, whose light is detected by a larger number of detectors. The current formed in the dark phases of the excitation as a result of the luminescence of the molecules can then be read out in parallel in the individual photodetectors and thereby assigned to the individual members of the molecule library.

Furthermore, in the case of excitation by an array of microlasers or light-emitting diodes, the spatial decoupling of excitation and detection can be achieved very easily by a relatively coarse grid of detectors which detect the luminescence of the molecules excited by the excitation laser, scattered in all spatial directions. For this only the one detector which detects the light emitted by the excitation laser needs to be masked out. Naturally, the temporal decoupling of excitation and detection can also be combined with the spatial decoupling.

In another embodiment of an apparatus for detecting optical properties of molecules bound on a support, in particular biological or biologically relevant molecules, comprising means for directing electromagnetic waves onto the support and a detector for observing the irradiated molecules, means for separating selected molecules are provided, which then makes it particularly advantageous to specifically separate molecules from the support if these had attracted attention in a first analysis step. The separated molecules can then be supplied to a further investigation, in particular a detector of a second type, e.g., a spectrometer, in particular a mass spectrometer, by which means specific properties of the separated molecules can be detected.

In an advantageous further development of the said apparatus, the means for separating can comprise a laser. However the use of an electrically controllable and chargeable support is particularly simple and advantageous for this purpose, in which case the molecules bound on the support can be separated very easily in selected regions by applying a voltage.

As supports for molecules, in particular biological molecules, in particular for use in one of the said methods, supports can be used according to the invention, comprising a fine-meshed network of integrated position markings so that it is possible to monitor the position of a location to be studied which is, for example approached by means of a usual mechanism with a detector on the support. In this case, the position markings are preferably configured so that they can be detected by an opto-electronic scanning system.

If a substantially commercially available compact disk is used as a support, along with cost advantages compared with the known diagnostic chips, this has the advantage that

substantially commercially available equipment, in particular the read and write lasers provided in CD players and CD burners can be used to study the support. If the compact disk is then configured to be transparent, the laser light can be used not only for opto-electronic detection of position but also at the same time for the excitation of luminescence reactions of molecules bound on the CD. Alternatively, CDs or analogue media having a wavelength filter integrated in the CD can be used, in which case a laser whose light cannot pass through the wavelength filter is used for the locally precise positioning of the CD whilst a second laser whose light can pass through the wavelength filter can be used for the repeated locally precise synthesis or excitation of a luminescence reaction as a result of its fixed distance with respect to the first laser.

Similar advantages are achieved by using an array of microlasers or light-emitting diodes to excite the luminescence reaction. The precise position information is obtained in this case by the relative arrangement of the microlasers with respect to one another so that precisely defined points on a preferably transparent support of molecule libraries arranged parallel over the array can be reproducibly illuminated almost arbitrarily frequently. At the same time, the support can consist of almost any material, in particular of derivatised glass for the synthesis of a molecule library.

In particular in the lithographic synthesis of a molecule library, the support of the molecule library can be particularly advantageously fixed above the array when using an array of microlasers or light-emitting diodes. In addition, an array of detectors can also be fixed thereon, which in particular makes it possible to calibrate the individual signals achieved with a uniformly fluorescence-labelled support.

The same applies to the mixed array of individually controllable silicon elevations (with the molecules applied thereon) with light-emitting diodes described further above. Such mixed arrays can also be fixed on a detector or an array of detectors if the voltage change produced by the luminescence signal is not even directly assigned to each individual silicon elevation so that in this case the support of the molecules is identical to the detector. This ensures a very simple but nevertheless extremely accurate, reproducible triggering of the individual pixels during the lithographic synthesis of the molecule libraries or synthesis controlled by application of a voltage and the subsequent staining and readout steps, and in addition there is no time-consuming triggering and focusing of the individual pixels. As a result of any moving parts, such an embodiment is particularly robust and easy to handle.

Highly complex molecule libraries, e.g. a peptide library, in particular a preferably complete 4-, 5-, 6- or 7mer peptide library or an oligonucleotide library, in particular a preferably complete 12-, 13-, 14- or 15mer oligonucleotide library or aptamer library can be applied to such a support such that the position of the individual molecules or molecular groups comprising a plurality of molecules of one type of molecule can be reproducibly exactly approached and thereby specifically investigated.

For application of molecules to a substantially flat surface of a support, there is on the one hand proposed according to the invention an apparatus comprising means for rotatable mounting of the support about an axis of rotation substantially perpendicular to the said surface of the support, means for applying various fluids to the surface of the support in the region of the axis of rotation and at least one laser which can be moved relative

to the support for irradiating selected regions of the support with laser light.

When using an array of microlasers or light-emitting diodes, a suitable, preferably transparent support is brought into the light beam of the light sources and fixed there. The exact position information is obtained in this case by the relative arrangement of the microlasers or light-emitting diodes with respect to one another so that precisely defined points on the support can be repeatedly illuminated. This can be used in particular for the lithographic synthesis and subsequent reading out of molecule libraries.

If the molecule libraries are applied to the support independently of the activity of the excitation laser or lasers, regularly arranged "guide dots" which can be detected in a suitable manner in relation to the applied molecule library serve as a reference point for determining the position of the applied different molecules.

Alternatively, an apparatus can also be used for this purpose in which nozzle-like means for applying extremely small quantities of molecules to be anchored on the support, means for moving the means for applying the molecules and the support relative to one another and at least one laser for irradiating selected regions of the support with laser light are provided.

Alternatively, molecules or molecule libraries can also be applied to the supports used using various already-known printing methods, e.g. using a modified screen-printing method for example, PCR fragments are imprinted instantaneously using the principle of the fountain pen, the latter allowing the synthesis of highly complex molecule libraries, but during the printing process the individual spots must be adapted to the readout mechanism

which is very time consuming since each spot must be approached and usually through-focused until finally the setting giving the maximum light yield is selected, which is superfluous when using a CD or an array of microlasers or light-emitting diodes, since in an array of microlasers in particular the individual pixels are transilluminated with almost parallel light. The same applies if an array of detectors is used as the support of the molecules.

In the case of a CD or similar supports, the said problem is very much ameliorated on account of the extremely fine-meshed network of position information, since a pit relative to which the molecules can be anchored on the support and read out is always located in the immediate vicinity.

In particular, if an array of individually controllable silicon elevations or a mixed array with light-emitting diodes, as described further above, is used as the molecule support, imprinted molecules can also be applied to the support as a result of a voltage applied in selected regions if the molecules to be applied carry a corresponding charge or were ionised in selected regions by means of the specifically-controllable light sources.

The invention therefore allows the person skilled in the art to select optimally suitable apparatus for applying the respective molecules to the respective supports, wherein in individual cases he will also combine both apparatuses and can initially apply one portion of the molecules to the support with one apparatus and then another portion of the molecules with the other apparatus.

Further details and advantages of the invention are obtained from the description of some embodiments, which is purely exemplary and not restrictive, in conjunction with the drawings.

Figure 1 illustrates the functioning principle of an apparatus for detecting a luminescence reaction of biological molecules 14 bound on the upper side 10 of a support 12, wherein the support 12 rotates about an axis 16 perpendicular to the upper side 10, as indicated by the arrow 18. In this case, the support 12 comprises a substantially commercially available CD which, however, is configured to be transparent and which is provided with recesses, so-called "pits", on its side opposite the upper side 10, which are indicated by the dashes 20 and which are located under a transparent protective layer.

The pits form internal position markings which can be read by the opto-electronic detection system of a conventional CD player or CD burner merely indicated here. The detection system consists in a known manner substantially of a laser, not shown here, and an adjustable or movable focusing coil or lens 24, as indicated by the movement arrow 22, which allows the beams 26 generated by the laser to be advantageously used both for scanning the pits 20 and therefore for determining the position and also, as at the time shown in the figure, for irradiating and possibly exciting the molecules 14 through the CD.

Downstream in the direction of movement of the CD, the site of the irradiation is followed by a light-sensitive detector 28 having an associated lens 30 which focuses the light beams 32 emitted by possibly excited molecules and guides them onto the detector 28. This arrangement ensures that the laser light does not perturb the detection process by superposition. In addition, luminescence reactions of excited molecules can thus be detected whilst at the same time new molecules are already being irradiated so that the investigation of the molecules arranged on the CD can advantageously be carried out at very high speed.

Figure 2 shows the use of an array 40 of microlasers 42, 44 for exciting molecules 50, 52 bound on a flat side 46 of a support 48. Since the microlasers are individually controllable and arranged in a fixed position relative to one another, precisely defined points on the transparent support 48, fixed parallel above the array 40 in the example shown, can be illuminated and molecules located there can possibly be excited to luminescence. Thus, at the time shown, the microlaser 42 is inactive whilst the microlaser 44 is active and emits light onto the molecule group 50. It should be stressed at this point that in this exemplary embodiment the support 48 is transparent, but the support need not necessarily be transparent since exciting light source and detector can be arranged on the same side of the support, i.e., on the side on which the molecules to be studied are located.

In this exemplary embodiment, an array 54 comprising a number of detectors 56, 58 is provided to detect possible luminescence reactions. This makes it particularly easy to separate excitation and detection in that the detector or detectors 58 located in the direct beam region of an active laser 44, i.e. effecting excitation of the molecules, are "switched off" at least during the emission of the laser, e.g. in such a manner that any radiation incident on the detector or detectors is not further detected or signals from the respective detectors are not passed on or evaluated. The other detectors 56 can also be switched off for the duration of the excitation phase, preferably under pulsed irradiation, but this is not absolutely necessary. In particular, it is possible to provide a wavelength filter 60 between the array 54 of detectors and the support 48, which filters out or at least strongly attenuates (as indicated by the beams 62') radiation 62 having the wavelength of the excitation laser, but allows luminescence radiation 64 to pass so that this can be detected by the active detectors 56 and converted into corresponding



signals which can then be passed on to a signal evaluation device known per se and therefore not described further here, e.g. a computer.

If a very accurate resolution of the individual pixels on the support is required for the synthesis and readout of a highly complex molecule library, a support shown in Fig. 2 can, for example, be firmly (but not undetachably) connected to the array of microlasers before a, for example, lithographic synthesis of a molecule library and this can remain during the synthesis and staining with a second substance (for example, the blood serum of patients) until reading out the luminescence reaction. The support can then be removed and a new support firmly connected to the array of microlasers. In addition, an array of detectors can be firmly connected to the array of microlasers, as shown in Fig. 10.

Alternatively, so-called "guide dots" can be inserted at regular intervals at regular distances on the support, each giving a defined luminescence signal and therefore taking over the function of the pits on the CD, i.e., providing an internal grid that is used for position information.

In these examples, the decoupling of excitation and detection is even simpler than in the example using a CD as a support since one microlaser after the other can be activated. For example, a coarser grid of photodiodes can be constructed over the array, each diode being switched off at the intensity maximum of the excitation laser which is just active.

If the power of the laser or lasers is controllable, the laser or lasers can also be used for separating selected molecules from the support, in which case the separated molecules can then be supplied in a suitable manner to a further investigation device, e.g. a mass spectrometer.

Once again as an example, Fig. 8 shows the basic principle of the method of investigation presented: selected regions 7 of a support 12 with molecules linked thereon or aggregates 4 to these molecules or with molecules 8 which interact with the linked molecules 2 or with the aggregates to these molecules 4, are irradiated with electromagnetic waves.

Figures 9 and 10 show schematically how the physical environment, in particular the matrix layer 3 of substances 5 in locally narrowly limited regions 7 can be modified by the irradiation with electromagnetic waves 13 (Fig. 9) or by the application of a voltage 13' (Fig. 10) so that the previously immobilised substances 9 are made mobile (mobile substances are indicated by 11) and can enter into the vicinity of the support 12. There, they can link to molecules 2 located on the support (form bonds), form an aggregate or become part of some other chemical reaction. It is additionally shown in Fig. 10 that the support 12 can be embedded in mixed array 17 of detectors 56 and of specifically controllably sources of electromagnetic radiation, e.g., light-emitting diodes 19. Selected regions 7 of the support 12 are expediently separated from one another by a non-conducting insulator 21 which is also impermeable to the emitted electromagnetic waves.

As is illustrated in Fig. 11, selected regions of a support fixed above the array can be repeatedly irradiated with spot accuracy using an array of individually controllable microlasers. As a result, molecules of a molecule library can be applied to selected regions of the support by lithographic methods. After staining the molecule library with a fluorescent dye, the fluorescent molecules are excited in successively selected regions by a short-term light pulse. The radiation produced by the fluorescence of the molecules between the excitation pulses is intercepted

by the photodetectors and can be ascribed to individual members of the molecule library so that it can be determined accurately at which molecules a fluorescence reaction was induced.

In a correspondingly configured mixed array 17 of individually controllable light sources 19 and detectors 56, as shown in Fig. 12, the detectors 56 themselves can be supports 12 of different molecules 2, 4 and 8. Such a mixed array 17 can be used, for example, to trigger a combinatorial molecular synthesis in selected regions 7, to briefly excite selected regions 7 with electromagnetic waves 6 and directly measure the luminescent reactions possibly produced by such excitation. In this case in particular, silicon supports, light-emitting diodes or an independent array of detectors can be used as detectors 56. A non-conducting insulator 21 which is impermeable to the emitted electromagnetic waves is provided for separating the regions 7 from one another.

Figures 13 and 14 show schematically how an array 23 of individually controllable detectors 27 (Fig. 13), which can be supports 12 of different molecules 2, 4 and 8 or an array of individually controllable light-emitting diodes 29 (Fig. 14) which can also be used as photodetectors, can be used to trigger a combinatorial molecular synthesis in selected regions, to briefly excite larger regions 25 or selected regions 7 with electromagnetic waves 6 and to directly measure the luminescence reactions possibly produced by such excitation in the dark phases of the excitation. In this case in particular, silicon supports can be used as detectors (Fig. 13). A non-conducting insulator 21 which is impermeable to the emitted electromagnetic waves is provided for separating the regions 7 from one another.

Some examples of the implementation of the methods according to the invention or of the application of the apparatus according to the invention are described subsequently:

- a) Synthesis of a complete 6mer peptide library on a CD under water-free conditions

The surface of a CD is coated with a plastic layer containing free amino groups for the solid-phase synthesis. After the linking of a suitable spacer of 2-3 amino acids length with the aid of standard fMoc peptide synthesis, free amino acids are then blocked with a light-cleavable protective group. The protective group to be linked is supplied through a tube onto the interior of the rotating CD. In this case a slightly modified synthesis program of a peptide synthesiser known per se can be used. A program which controls the activity of a burning laser cleaves the protective groups on the regions where the amino acid alanine is to be linked in the first step. The protective group is cleaved by 2-photon activation using the burning laser and a somewhat less-focused second laser irradiating from above. After the selective cleaving of the protective group, the activated amino acid alanine is supplied to the CD through the aforementioned tube. The activated amino acid links to the free amino groups, wherein the amino group belonging to the amino acid has been previously blocked by the same protective group as mentioned above. This process is repeated for the other 19 amino acids and the entire process is repeated 6 times in total. In the last step, the protective groups are cleaved from all synthesised peptides.

- b) Synthesis of a complete 5mer peptide library using an array of microlasers

A suitable flat transparent support which contains free amino groups is fixed above the array of microlasers. Particularly suitable in this case are thin glass disks which are cleaned with concentrated NaOH, then washed with water and derivatised for 2 hours at room temperature 10% (vol/vol) bis(2-hydroxyethyl)aminopropyltriethoxy silane. Alternatively a suitable flat transparent support can be coated with a plastic layer which contains free amino groups for the solid-phase synthesis.

A suitable spacer of 2-3 amino acids length is initially synthesised at the free amino groups with the aid of standard fMoc peptide synthesis under water-free conditions, familiar to the person skilled in the art.

The support is then divided parallel to the X axis into twenty separate regions which are wetted by the 20 different activated fMoc derivatives of the amino acids each dissolved in DMF.

The linking of the activated amino acids then takes place at room temperature for 30-60 minutes. After washing three times with dimethylformamide (DMF), the fMoc protected group is cleaved with the aid of 20% piperidine in DMF and again washed with DMF.

The support is again divided into twenty separate regions, this time parallel to the Y axis. These regions are again wetted by the 20 different activated fMoc derivatives of the amino acids, each dissolved in DMF, followed by the standard fMoc peptide synthesis described above, which is familiar to the person skilled in the art.

Following the cleaving of the N-terminal protective group as described above, at this stage the support described above is divided into 400 regions delimited from one another, with respectively one of 400 possible dipeptides

linked C-terminally to the support by a spacer whose N terminus is free, i.e. present without a protective group.

For the next linking steps the activated amino acids described above are dissolved individually in a suitable solvent which is liquid at 50°C, and solid at 4°C instead of in DMF, a suitable laser-light-absorbing additive which is inert in relation to the amino acids, in particular a dye or graphite particles is added, the solution is deep-frozen and pulverised into small particles.

The particles are nebulised at 4-10°C on the support fixedly mounted above an array of microlasers, a cover plate is placed thereover and selected regions are irradiated for 20-30 minutes with the microlasers. The absorption of laser light by the added light thereby locally heats the solvent frozen at the selected temperatures in the irradiated regions and thus enables the linking of the activated amino acids to the free amino groups exclusively in these regions. The cover plate is then removed and the non-linked amino acids are washed away with DMF, this washing process being repeated twice with heated DMF.

This process is repeated a total of 20 times with all the activated amino acids so that the 400 regions delimited from one another, described above, are divided into 20x400 defined regions, followed by the above-described cleaving of the fMoc protective groups with 20% piperidine in DMF.

The extension of the peptides by a fourth and fifth amino acid then takes place similarly to the synthesis of the third amino acid, wherein as described above, each region is divided into 20 regions in each synthesis step.

Finally all the protective groups are cleaved with 10% silane in concentrated trifluoroacetic acid, the support is

washed with DMF and methanol, and dried so that finally a support having  $20^5 = 3,200,000$  different regions is formed, each representing one of all the possible C-terminally linked pentapeptides.

- c) Investigation of a blood serum using a compact disk with a peptide library fixed thereon

The CD is stained with the blood serum of a patient, for which non-specific bonds are initially blocked with a suitable aqueous solution such as, for example, 2% milk powder in PBS and the blood serum is diluted in the same buffer, whereupon the surface of the CD is then wetted with the serum whilst gently agitating for 60 minutes. The CD is washed three times. The goat-anti-human antibody linked to the dye Cy5 is diluted in 2% milk powder in PBS; the surface of the CD is then wetted for 60 minutes whilst agitating gently and then washed three times. The compact disk stained with the second anti-body is read out in a modified CD player.

- d) Readout of a stained compact disk by means of a modified CD burner

A burning laser set to weak wattage scans the CD in the first run. Any fluorescence signals are then detected with the aid of the optics additionally built into the CD burner and ascribed to the individual CD regions. This additional optics consists of a focusing lens which images one, or if desired, a plurality of pits on a photomultiplier or a CCD camera. The lens thereby images a point in the running direction of the CD outside the maximum of the irradiating laser. In addition, the scattered laser light is separated from the fluorescence signal by a suitable edge filter. The regions of the CD which delivered a signal in the first run are specifically controlled and multiply scanned. The

signals which are read off in this case are summed and ascribed to the positive pits.

- e) Investigation of blood serum using a support with peptide library fixed therein

As described in Example c), the support fixedly mounted on an array of microlasers in this example with a lithographically synthesised complete pentapeptide library described in Example b) is blocked with a suitable aqueous solution, preferably 2% milk powder in PBS, incubated with the diluted blood serum of patients, and then stained with goat anti-human antibody linked to a Cy5.

Then, one microlaser after the other is switched on sequentially and the light emitted by possibly bound fluorescence molecules is read out by means of a coarser grid of photodiodes over the array of microlasers, each diode being switched off at the intensity maximum of the excitation laser which had just been active (cf. Fig. 2). The scattered light caused by the excitation laser is additionally separated from the fluorescence light by a suitable wavelength filter. In order to improve the signal/noise ratio still further, the irradiating microlaser can be pulsed, the fluorescence signal being detected in the dark phases of the irradiating laser.

The fluorescence signals are divided into a total of ten different brightness steps, which are ascribed to the individual microlasers (i.e. in this case the different pentapeptides).

The microlasers which delivered the highest fluorescence signals in a first run can then be used many times successively for excitation, after which the fluorescence signals obtained are averaged.



- f) Synthesis of a complete 12mer oligonucleotide library on a support using an array of microlasers

As described in Example b) for the synthesis of a complete 5mer peptide library, a suitable flat transparent support with free amino groups is used.

If not already present from the first step, a suitable linker is synthesised at the free amino groups with the aid of standard synthesis familiar to the person skilled in the art under water-free conditions, which linker in turn anchors free amino groups in the support which this time, however, are about 22 atoms away from the surface.

The support is then divided parallel to the X axis into four separate regions which are wetted by four different activated nucleoside anhydrides with protective groups. The nucleosides then link to the free amino groups (Fig. 3). Instead of the base-cleavable linker, a linker which is stable under these conditions can also be used.

The linking of the activated nucleosides (with protective groups) to the solid support, the cleaving of the protective groups and the washing steps take place under standard conditions for oligonucleotide synthesis known to the person skilled in the art. Examples of the protective groups used are:

- DMTr for the 5' end of the nucleoside (Fig. 3)
- Benzoyl in the case of the bases adenine and cytosine (Fig. 4)
- Isobutryl in the case of the base guanine (Fig. 4)
- Methoxy - or beta-cyanoethyl - in the case of the phosphate groups (Fig. 4)

After the cleaving of the DMTr protective group from the 5' end of the nucleoside, in the next step the support is again divided into four separate regions which this time run parallel to the Y axis. These regions are this time wetted by four different activated phosphoramidite derivatives activated using a weak acid such as tetrazole. Due to the linking of the activated phosphoramidite to the free 5'-OH end, a chain lengthening by one base takes place (Fig. 5).

In the next step any remaining 5'-OH ends are provided with a "cap" so that they can no longer participate in subsequent reactions (Fig. 6).

A last step in which trivalent phosphate groups are oxidised concludes the synthesis cycle (Fig. 7).

The synthesis described above corresponds to the standard oligonucleotide synthesis familiar to the person skilled in the art. Unlike the familiar standard synthesis, however, the oligonucleotides are anchored on the solid support in such a manner that following the final complete cleaving of the protective groups, they are not cleaved from the support but remain linked to the support.

Then, the DMTr protective group is in turn cleaved from the 5'-OH end using TCA so that at this stage 16 divided regions, delimited from one another, are located on the support described above with each one of 16 possible dinucleotides linked to the support via the 3' end by a spacer, the 5' end thereof bearing a free OH group.

For the next linking step, the activated phosphoramidite derivatives described above are dissolved individually in a suitable solvent which is liquid at 50°C and solid at 4°C, instead of in acetonitrile, a suitable laser-light-

absorbing dye which is inert in relation to the activated nucleosides, in particular graphite particles, is added, the solution is deep-frozen and pulverised into small particles.

These particles are nebulised at 4-10°C on the support fixedly mounted above an array of microlasers, a cover plate is placed thereon and selected regions are irradiated with the microlasers for 20-30 minutes. The absorption of the laser light by the added dye locally heats the solvent frozen at the selected temperatures in the irradiated regions and thus enables linking of the activated phosphoramidite derivatives to the free 5-OH ends exclusively in these regions. The cover plate is then removed and the non-linked phosphoramidite derivatives are washed away with cold acetonitrile. This washing process is then repeated twice with heated acetonitrile.

This process is repeated a total of four times with all the activated phosphoramidite so that the 16 regions delimited from one another, described above, are divided into 4 x 16 defined regions, followed by the "capping" described above of the remaining free 5'-OH ends, oxidation of the trivalent phosphate groups and a renewed cleaving of the DMTr protective groups with TCA.

The extension of the oligonucleotides by a further nine bases is then carried out similarly to the synthesis of the third base, wherein, as described above, at each synthesis step each region is divided into 4 defined regions.

Finally, all the protective groups are cleaved with dichloromethane and trichloroacetic acid, the support is washed with acetonitrile and dried so that finally a support having  $4^{12} = 16,777,216$  different regions is formed, each representing one of all the possible 12mer oligonucleotides linked via the 3' end.

- g) investigation of patient DNA using an array of microlasers with a 12mer oligonucleotide library fixed on a support

The support described under Example f) with a complete oligonucleotide library fixed thereon is stained with patient DNA. Non-specific bonds are saturated, for example, with DNA from herring sperm.

A tumour tissue sample and at the same time a healthy tissue sample is taken from the patient and genomic DNA contained therein is multiplied with the aid of one or a pair of tumour-gene specific primers (specific, for example for the genes p53, p16, ras, c-myc, n-myc) in a polymerase chain reaction. In this case, FITC-labelled dNTPs are inserted into the tumour sample or the normal sample is labelled with biotinylated dNTPs, the samples are mixed and hybridised on the support. The hybridised sample is then subsequently stained with a chemically linked protein of streptavidin and phycoerythrine to which the fluorescence dye Cy5 had been additionally linked. As a result, two different fluorescences can be measured with one excitation wavelength.

As described in Example e), one microlaser after the other is then sequentially switched on and the light emitted by any bound fluorescence molecules is read out with the aid of a coarser grid of photodiodes above the array of microlasers, wherein in each case the diode is switched off at the intensity maximum of the excitation laser which has just been active. The scattered light caused by the excitation laser is additionally separated from the fluorescence light by a suitable wavelength filter. The wavelength filter is tuned once to the fluorescence dye FITC and on the other hand to the tandem dye phycoerythrine-Cy5 (PE-Cy5).

The fluorescence signals are then each divided into a total of 10 different brightness steps which are ascribed to the individual microlasers, (i.e. in this case the different oligonucleotides).

The microlasers which gave a ratio of the FITC staining to the PE-Cy5 staining strikingly different from the other pixels in a first run are then used many times in succession for excitation, after which the fluorescence signals obtained are summed and the ratio of the FITC staining to the PE-Cy5 staining is again determined.

In this way, point mutations in genes which are important for the prognosis of tumour diseases are diagnosed. Unlike the systems available on the market, many genes can be analysed simultaneously using a complete 12mer oligonucleotide library.

In an alternative approach, the DNA taken from the patient is used as a template for multiplication with so-called Alu primers which hybridise at the edges of repetitive Alu sequences occurring very frequently in the genome and multiply the non-repetitive DNA between two Alu sequences. FITC-labelled dNTPs are again inserted into the tumour sample or biotinylated dNTPs are inserted into the normal sample and the samples mixed on the support are hybridised.

The fluorescence signals are then read out as described above. In this way the entire genome is scanned for differences between normal and tumour tissue with the result that new diagnostic markers can be discovered which yield important information for the tumour progression.

- h) Combination of the fluorescence detector according to Example d) with a mass spectrometer

The fluorescence detector according to Example d) or only the CD burner part without additional fluorescence optics is encased in an evacuable vessel. The focal point of the burning laser is located at the position of the normal sample holder of a mass spectrometer. The burning laser can trigger arbitrary points on the CD and the molecules located there are expelled and can then be studied by means of the mass spectrometer.

Such a combined device makes it possible to analyse the binding partners formed by the combination of two highly complex molecule libraries whereas in the hitherto known techniques it is only possible to combine and analyse two molecule libraries which are several orders of magnitude less complex. Instead of the mass spectrometer, a movable apparatus can also be attached by which means phages or DNA can be recovered from individual pits of the CD.

- i) Sequencing of complex DNA by means of solid-phase linked oligos

The complete 12mer oligonucleotide library described in Example f) is used. Unlike Example f), in this case however, the direction of synthesis must be "turned around", i.e., the cleavable protective group analogous to DMTr must be located at the 3'-OH end so that at the finish a solid-phase-linked oligonucleotide library with free 3' ends is present. The hybridisation conditions are selected so that only a very few mismatches, if any, occur between the oligonucleotides and the templates hybridised thereon. The complexity of the solid phase-linked oligonucleotides should exceed that of the DNA to be sequenced. Non-hybridised c-DNA is washed away. A Sanger sequence reaction is carried out with comparatively many ddNTPs in the reaction solution so that on average an extension of the oligoprimer by an average of 20 nucleotides takes place. The template is then separated again by heat. The sequence

information is then read out in the combined CD burner-mass spectrometer described in example h) in which case the burning laser vaporises selected oligonucleotides extended by the sequence reaction so that the sequence information can then be detected by means of the mass spectrometer.

PATENT CLAIMS

1. A method for detecting a luminescence reaction of molecules bound on a support, in particular biological molecules, wherein electromagnetic waves (excitation light), in particular laser light, are directed onto the support and any luminescence reactions of the molecules bound on the support, are detected by a detector, **characterised in that** substantially only the light emitted by the molecules (detection light) is detected by the detector.
2. The method according to claim 1, **characterised in that** excitation light and detection light are spatially separated.
3. The method according to claim 1 or 2, **characterised in that** excitation light and detection light are temporally separated.
4. The method according to any one of claims 1 to 3, **characterised in that** the detector and the support are moved relative to one another after the irradiation or during the irradiation with the electromagnetic waves.
5. The method according to claim 4, **characterised in that** support and detector are turned relative to one another so that molecules irradiated by the electromagnetic waves moves into a range which can be detected by the detector.
6. The method according to claim 4 or 5, **characterised in that** the relative movement of support and detector takes place in a time interval which lies in the order of magnitude of the fluorescence lifetime of the excited molecules.



7. The method according to claim 1, **characterised in that** the electromagnetic waves are only irradiated briefly, in particular in pulsed mode, onto the support.
8. The method according to claim 8, **characterised in that** during the irradiation, the detector possibly does not detect light emitted by the irradiated molecules.
9. The method according to one of claims 7 or 8, **characterised in that** after the irradiation, the detector detects light emitted by the irradiated molecules in a time-delayed manner.
10. The method according to any one of claims 1 to 9, **characterised in that** an array comprising a number of specifically controllable light sources is used.
11. The method according to any one of claims 1 to 10, **characterised in that** an array of detectors is used.
12. The method according to any one of claims 1 to 11, in which a number of light sources and a number of detectors are used, **characterised in that** at least one detector is associated with each light source.
13. The method according to claim 12, **characterised in that** each detector associated with a light source is switched passively during operation of the light source.
14. The method according to claim 12, **characterised in that** each detector associated with a light source is switched actively during operation of the light source.
15. The method according to claim 12, **characterised in that** a mixed array of microlasers and detectors is

used to excite the molecules for the purpose of detecting specific optical properties and as a detector to detect these properties.

16. The method according to any one of claims 1 to 15, **characterised in that** an array of detectors is used as a support of the molecules.
17. The method according to any one of claims 1 to 16, wherein an array of detectors is used, **characterised in that** a plurality of arrays of detectors are excited simultaneously with electromagnetic waves.
18. The method according to any one of claims 1 to 17, wherein an array of detectors is used, **characterised in that** an opaque layer is located between the individual detectors of an array of detectors.
19. The method according to claim 18, **characterised in that** the opaque layer between the individual detectors of any array projects over the plane of the bound molecules.
20. The method according to claim 1, **characterised in that** the support is a particle, in particular a cell, which is analysed using an FACS device (Fluorescence Activated Cell Sorter or Cell Scanner).
21. The method according to claim 1, **characterised in that** the support is analysed using a fluorescence microscope.
22. The method according to claim 1, **characterised in that** the support is analysed using a confocal laser scanning microscope.

23. The method according to claim 1, **characterised in that** the support is analysed using a phospho-imager.
24. The method according to claim 1, wherein an array of molecules is applied to the support, **characterised in that** selected regions of the support are briefly irradiated with electromagnetic waves, in particular with pulsed light.
25. The method according to claim 1, **characterised in that** selected regions of the support are analysed using the principle of the confocal laser scanning microscope.
26. The method according to claim 24 or 25, **characterised in that** fluorescence signals of individual pixels of the array of molecules are measured in different focusing planes.
27. The method according to any one of claims 24 to 26, **characterised in that** the intensity of the fluorescence signals in different focusing planes is fed back to the adjustment of the focusing plane.
28. The method according to claim 1, **characterised in that** the support is a separating medium, in particular a chromatographic separating medium by which means a molecular mixture is temporally and/or spatially separated and that the separated molecules are analysed by one or more lasers.
29. The method according to claim 28, **characterised in that** the chromatographically separated molecular mixture is formed by a sequencing reaction.
30. The method according to any one of claims 1 to 29, **characterised in that** an optical imaging system is

inserted between the excitation system and the support.

31. The method according to any one of claims 1 to 30, **characterised in that** an optical imaging system is inserted between the support and the detection system.
32. The method according to claim 30 or 31, **characterised in that** an optical imaging system is used, which comprises at least one lens system or an array of lens systems.
33. The method according to claim 30 or 31, **characterised in that** the optical imaging system comprises at least one optical grating.
34. The method according to claim 30 or 31, **characterised in that** the optical imaging system used comprises at least one optical mirror or an array of optical mirrors.
35. The method according to claim 30 or 31, **characterised in that** the optical imaging system comprises optical fibres or an array of optical fibres.
36. The method according to claim 30 or 31, **characterised in that** the optical imaging system comprises a graded-index lens system or an array of graded-index lens systems.
37. The method according to claim 1, wherein at least one excitation light source is used to emit the electromagnetic waves, **characterised in that** support and excitation light source are fixed relative to one another.

38. The method according to claim 1, wherein at least one excitation light source is used to emit the electromagnetic waves, **characterised in that** an array of excitation light sources which is fixed to the support is used as the excitation light source.
39. The method according to claim 1, wherein at least one excitation light source is used to emit the electromagnetic waves, **characterised in that** support, excitation light source and detector are fixed relative to one another.
40. The method according to claim 1, wherein at least one excitation light source is used to emit the electromagnetic waves, **characterised in that** an array of excitation light sources which are fixed to the support and the detector is used as the excitation light source.
41. The method according to claim 1, wherein at least one excitation light source is used to emit the electromagnetic waves, **characterised in that** a mixed array of excitation light sources and detectors which are fixed relative to the support is used.
42. The method according to any one of claims 37 to 41, **characterised in that** a support marked uniformly with a luminescence dye is used and that the luminescence signal thereby obtained is used to calibrate the individual excitation light sources of the array.
43. A method for detecting optical properties of molecules bound on a support, in particular biological or biologically relevant molecules, wherein electromagnetic waves are directed onto the support and the irradiated molecules are observed with a detector, **characterised in that** selected molecules are

separated from the support and fed to a second detector for detecting further, not necessarily optical properties.

44. The method according to claim 43, **characterised in that** the selected molecules are automatically separated from the support.
45. The method according to claim 43 or 44, **characterised in that** before the detection of further, not necessarily optical properties, the selected molecules are multiplied in particular by polymerase chain reaction or biological replication.
46. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the separation of the molecules is effected by means of a photolabile linker.
47. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the separation of the molecules is effected by means of ionisation.
48. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the separation of the molecules is effected by electromagnetic radiation.
49. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the separation of the molecules is effected by applying an electrical voltage.
50. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the separation of the molecules is effected by means of an enzymatic reaction.

51. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the separation of the molecules is effected by varying the ion concentration.
52. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the separation of the molecules is effected by varying the pH.
53. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the separation of the molecules is effected with the aid of a catalyst.
54. The method according to any one of claims 43 to 53, **characterised in that** the separated molecules are component parts of liposomes, virus particles, retroviruses, bacteriophages, viroids or cells, in particular B lymphocytes, T lymphocytes, leucocytes or bacteria.
55. The method according to any one of claims 43 to 53, **characterised in that** the separated molecules are component parts of complexes of nucleic acid and protein, in particular of "ribosomal display" complexes or of DNA laden with DNA-binding fusion proteins.
56. The method according to any one of claims 43 to 53, **characterised in that** the separated molecules are component parts of complexes of nucleic acid and other molecules, in particular synthetically produced complexes of DNA and a ligand.
57. The method according to any one of claims 43 to 56, **characterised in that** a mass spectrogram of the separated molecules is produced by a detector.

58. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the selected molecules are separated from the support by irradiation by electromagnetic waves, in particular by irradiation by laser light.
59. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** the selected molecules are separated from the support by application of an electric voltage.
60. The method according to claim 59, **characterised in that** the electrical voltage is generated in the support.
61. The method according to any one of claims 43 to 45, **characterised in that** before separation from the support, the selected molecules are modified by enzymatic reactions.
62. The method according to claim 61, **characterised in that** the enzymatic modification was brought about by a polymerisation reaction by means of a template-dependent DNA polymerase.
63. The method according to claim 61 or 62, **characterised in that** the polymerisation reaction by the addition of ddNTPs results in a family of differently extended oligonucleotides.
64. A method for detecting optical properties of molecules bound on a support, in particular biological or biologically relevant molecules, in particular according to any one of claims 1 to 63, **characterised in that** a support having integrated position markings which can be detected by a detector is used.



65. The method according to claim 64, **characterised in that** a substantially commercially available compact disc (CD), a digital video disc (DVD), a magneto-optical disc (MOD) or the like is used as a support.
66. The method according to claim 65, **characterised in that** the molecules to be studied are applied to one flat side and the position markings are applied to the other flat side of the support.
67. The method according to any one of claims 64 to 66, **characterised in that** an opaque support is used.
68. The method according to any one of claims 64 to 67, **characterised in that** use is made of a support containing a wavelength filter.
69. The method according to any one of claims 1 to 67, **characterised in that** at least one wavelength filter is connected between support and detector.
70. The method according to any one of claims 1 to 69, **characterised in that** use is made of a support onto which a molecule library is applied.
71. The method according to any one of claims 1 to 70, **characterised in that** use of made of a support onto which a preferably complete peptide library containing L amino acids, in particular a 4mer, 5mer, 6mer or 7mer peptide library is applied.
72. The method according to any one of claims 1 to 70, **characterised in that** use of made of a support onto which a preferably complete peptide library containing D amino acids, in particular a 4mer, 5mer, 6mer or 7mer peptide library is applied.

73. The method according to any one of claims 1 to 70, **characterised in that** use of made of a support onto which a preferably complete peptide library comprising L and D amino acids, in particular a 4mer, 5mer, 6mer or 7mer peptide library is applied.
74. The method according to any one of claims 1 to 70, **characterised in that** use of made of a support onto which an aptamer library is applied.
75. The method according to any one of claims 1 to 70, **characterised in that** use of made of a support onto which an oligosaccharide library is applied.
76. The method according to any one of claims 1 to 70, **characterised in that** use of made of a support onto which a molecule library produced with the aid of chemical combinatorics is applied.
77. The method according to any one of claims 1 to 70, **characterised in that** use of made of a support onto which a preferably complete oligonucleotide library, in particular a 12-, 13-, 14- or 15mer oligonucleotide library is applied.
78. The method according to claim 77, **characterised in that** the individual monomers of the oligonucleotide library are mirror images of the naturally occurring monomers.
79. The method according to any one of claims 1 to 70, **characterised in that** use is made of a support onto which proteins, in particular recombinantly expressed proteins, DNA fragments, PCR products, cDNA fragments or RNA fragments are applied.

80. The method according to any one of claims 1 to 79, wherein use is made of a support onto which a molecule library is applied, **characterised in that** the molecule library was modified chemically, in particular by an addition reaction, an elimination reaction, a substitution reaction, a rearrangement reaction or an addition reaction with substances already bound on the support.
81. The method according to any one of claims 70 to 80, **characterised in that** the support is brought in contact with the fluid to be studied.
82. The method according to claim 81, **characterised in that** the fluid to be studied comprises blood, blood serum, urine, faeces, lymph, saliva, amniotic fluid, gastric juice, vomit, sweat, semen, breast milk, lachrymal fluid, fluid containing an antibody or an extract from the specified fluids.
83. The method according to claim 82, wherein the fluid to be studied in particular is a blood serum, **characterised in that** the fluid is brought in contact with a detection reagent specific to immunoglobulins.
84. The method according to claim 83, **characterised in that** the fluid to be studied is brought in contact with a detection reagent specific to immunoglobulins of type E.
85. The method according to claim 83, **characterised in that** the fluid to be studied is brought in contact with a detection reagent specific to immunoglobulins of type M.
86. The method according to claim 83, **characterised in that** the fluid to be studied is brought in contact

with a detection reagent specific to immunoglobulins of type G.

87. The method according to any one of claims 81 to 83, **characterised in that** the fluid to be studied is brought in contact with a detection reagent specific to immunoglobulins of type A.
88. The method according to any one of claims 70 to 80, **characterised in that** the support is brought in contact with the DNA to be studied.
89. The method according to any one of claims 81 to 89, wherein fluid containing DNA or an immunoglobulin is to be studied, **characterised in that** after or before the bringing into contact with the support, the fluid to be studied or the DNA to be studied is brought in contact with a substance which reacts with immunoglobulins or with DNA, in particular forms bonds.
90. The method according to claim 89, **characterised in that** before the bringing in contact with the fluid to be studied or the DNA to be studied, the substance which reacts with immunoglobulins or DNA is stained with a substance which can be excited to luminescence.
91. The method according to claim 89 or 90, **characterised in that** before or during the bringing in contact with the fluid to be studied or the DNA to be studied, the substance which reacts with immunoglobulins or DNA is linked to a further substance which can produce luminescence, in particular substances which are luminescent with enzymes or precursors.
92. The method according to claim 91, **characterised in that** the further substance is an enzyme, in particular

horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta galactosidase, glucose oxidase, lactate dehydrogenase or luciferase or a bond of enzymes.

93. The method according to any one of claims 90 to 92, **characterised in that** a dye which can be excited to fluorescence by irradiation by electromagnetic waves, in particular laser light or light from light-emitting diodes is used as the substance which can be excited to luminescence.
94. A method for the systematic classification and segmentation of pathological samples, in particular for the determination of diagnostic markers, **characterised in that** a method according to any one of claims 81 to 93 is carried out for a plurality of test subjects and the deviations from the normal distribution are determined in the test results.
95. The method according to claim 95, **characterised in that** a blood serum sample was obtained from each test subject and was investigated according to one of the said methods.
96. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were determined for test subjects who become ill with cancer before or after taking the blood serum.
97. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were determined for test subjects who had suffered a heart attack or stroke before, during or after taking the blood serum.
98. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were

determined for test subjects who become ill with Parkinson's disease before or after taking the blood serum.

99. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were determined for test subjects who become ill with multiple sclerosis before or after taking the blood serum.
100. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were determined for test subjects who become ill with Alzheimer's disease before or after taking the blood serum.
101. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were determined for test subjects who become ill with infectious diseases before, during or after taking the blood serum.
102. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were determined for test subjects who become ill with autoimmune diseases before or after taking the blood serum.
103. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were determined for test subjects who were or became allergy sufferers before, during or after taking the blood serum.
104. The method according to claim 95, **characterised in that** deviations from the normal distribution were determined for test subjects who become ill with

Crohn's disease before or after taking the blood serum.

105. A method for the automatic classification of signals, in particular for the determination of diagnostic samples, **characterised in that** the signals obtained by a method according to any one of claims 81 to 104 are related to structural parameters of the corresponding molecules of the molecule library and correlations are thus identified, in particular those which allow a diagnostic assessment of samples of unknown specimens.
106. A method for the automatic classification of signals, **characterised in that** the signals obtained by a method according to any one of claims 81 to 104 are related to structural parameters of the corresponding molecules of the molecule library, in particular in order to identify common structural features of the identified molecules.
107. The method according to claim 106, **characterised in that** structural features thus defined of the identified molecules are used as lead structures for the development of functionally homologous other molecules, in particular therapeutically applicable molecules.
108. A method for the detection of optical properties of molecules bound on a support, in particular biological or biologically relevant molecules, in particular according to any one of the preceding claims, **characterised in that** an array of specifically excitable sources of electromagnetic radiation, in particular an array of microlasers or light-emitting diodes, is attached to a support.

109. The method according to claim 108, **characterised in that** the array is attached to the support before the molecules bound on the support, in particular a peptide, aptamer, oligosaccharide, oligonucleotide library or a molecule library produced with the aid of chemical combinatorics are applied to the support.
110. The method according to claim 108 or 109, **characterised in that** the array is attached to the detector before the molecules bound on the support, in particular a peptide, aptamer, oligosaccharide, oligonucleotide library or a molecule library produced with the aid of chemical combinatorics are applied to the support.
111. The method according to any one of claims 108 to 110, **characterised in that** the array is attached to the support and to a detector or an array of detectors.
112. The method according to any one of claims 108 to 111, **characterised in that** a mixed array of specifically excitable sources of electromagnetic radiation, in particular of microlasers or light-emitting diodes and detectors is used.
113. The method according to any one of claims 108 to 112, **characterised in that** the attachment of the support on the array of specifically excitable sources of electromagnetic radiation, in particular on an array of microlasers or on an array of light-emitting diodes is maintained during the application of the molecule library, the bringing in contact of the molecule library with the fluid to be studied according to any one of claims 81 to 93, until the readout of the luminescence reaction.



114. The method according to any one of claims 108 to 112, **characterised in that** an imaging system according to claim 30 to 36 images the array of excitation lasers onto the support.
115. The method according to any one of claims 108 to 115, **characterised in that** the detector, the specifically excitable sources of electromagnetic radiation and support are fixed relative to one another at least during the investigation.
116. A method for the application of a peptide library to a support, in particular to a support which can be used in a method according to any one of the preceding claims, **characterised in that**
- a surface of the support is coated with a plastic layer which contains free amino groups and is suitable for the solid phase synthesis of a peptide library,
  - the free amino groups are blocked by a light-cleavable protective group,
  - that protective groups in specific regions of the support are cleaved by means of a laser,
  - that an activated amino acid whose own amino group is blocked by a light-cleavable protective group is applied to the support such that the amino acid is distributed on the support and links to the free amino groups,
  - that the process steps "cleaving of protective groups in specific regions of the support" and "supplying an activated amino acid whose own amino group is blocked by the light-cleavable

protective group" are repeated for different, preferably all 20 amino acids and

- that finally the protective groups of all synthesised peptides are cleaved.

117. A method for the application of a peptide library to a support, in particular to a support which can be used in a method according to any one of the preceding claims, ***characterised in that***

- monomers for the synthesis of a molecule library are activated in a spacer containing a free amino or OH group blocked by a light-cleavable protective group and are dissolved with a solvent having a melting point between 0°C and 40°C, at a temperature at which the solvent is liquid,
- that a dye which can absorb light emitted by a laser is supplied to the mixture of spacer and solvent,
- that the mixture is deep-frozen and pulverised,
- that the pulverised and deep-frozen mixture is nebulised in the solid state above the support,
- that selected regions on the support are irradiated with electromagnetic waves, in particular laser light, in such a manner that this results in thawing of the mixture and a linking to the support,
- that the non-liquefied, non-linked mixture is washed from the support with solvent, preferably heated solvent and

- that the protective group is cleaved by irradiation by light.

118. A method for the application of a molecule library to a support, in particular a flat side of a compact disc, **characterised in that**

- molecules are applied to the support by means of an apparatus, in particular by means of an apparatus having a nozzle, and
- that selected regions of the support are irradiated with laser light in such a manner that this results in an anchoring of the applied molecules on the support in these regions.

119. A method for the application of substances (5), in particular of molecules to a support (12), **characterised in that**

- an immobilised substance (9) is made mobile in a locally narrowly restricted selected region (7) by varying the physical environment, in particular the matrix layer (3),
- that the substance (11) thus made mobile is brought into the vicinity of the support (12), in particular the support surface (46), by means of a physical process,
- that the substance (11) thus made mobile binds to molecules (2) or atoms located on the support (12) or forms an aggregate (4) or undergoes a chemical reaction with these,
- that the substances (11) thus made mobile are or yield many different substances.

120. The method according to claim 119, **characterised in that** a solid substance is fused in selected regions.
121. The method according to claim 119 or 120, **characterised in that** a solid substance is fused in selected regions by the irradiation by electromagnetic waves.
122. The method according to claim 119 or 120, **characterised in that** a solid substance is fused in selected regions by the application of an electrical voltage to a part of the support.
123. The method according to claim 119, **characterised in that** a solid substance is brought into a gel-like state in selected regions.
124. The method according to any one of claims 119 or 123, **characterised in that** a solid substance is brought into a gel-like state in selected regions by irradiation by electromagnetic waves.
125. The method according to any one of claims 119 or 123, **characterised in that** a solid substance is brought into a gel-like state in selected regions by the application of an electrical voltage to a part of the support.
126. The method according to claim 119, **characterised in that** a previously immobilised substance is thermally cleaved in selected regions.
127. The method according to any one of claims 119 or 126, **characterised in that** in selected regions a previously immobilised substance is thermally cleaved by the irradiation by electromagnetic waves.

128. The method according to any one of claims 119 or 126, **characterised in that** in selected regions a previously immobilised substance is thermally cleaved by the application of an electrical voltage to a part of the support.
129. The method according to claim 119, **characterised in that** a previously immobilised substance is made soluble in selected regions.
130. The method according to any one of claims 119 or 129, **characterised in that** in selected regions a previously immobilised substance is made soluble by irradiation by electromagnetic waves.
131. The method according to any one of claims 119 or 129, **characterised in that** in selected regions a previously immobilised substance is made soluble by the application of an electrical voltage to a part of the support.
132. The method according to claim 119, **characterised in that** in selected regions of the support, a previously immobilised substance is made soluble by release from cage structures, in particular by release from fullerenes or nanotubes.
133. The method according to any one of claims 119 or 132, **characterised in that** the release of the molecules is effected by irradiation by electromagnetic waves or application of an electrical voltage to a part of the support.
134. The method according to any one of claims 119 to 133, **characterised in that** the previously solid or

immobilised substance contains a substance that absorbs irradiating electromagnetic waves.

135. The method according to any one of claims 119 to 134, **characterised in that** the previously solid or immobilised substance contains molecules which can react with molecules already linked to the support after being made mobile.
137. The method according to any one of claims 119 to 134, **characterised in that** the previously solid or immobilised substance contains activated monomers, dimers or trimers for molecular synthesis, which can link to the support in the mobile state.
138. The method according to any one of claims 119 to 137, **characterised in that** the solid or immobilised substance has a melting point between 0°C and 45°C.
139. The method according to any one of claims 119 to 138, **characterised in that** the melting point between 0°C and 45°C is achieved by mixing solvents having a different melting point.
140. The method according to any one of claims 119 to 139, **characterised in that** the solid substance contains another substance which absorbs irradiating electromagnetic waves, in particular graphite particles.
141. The method according to any one of claims 119 to 139, **characterised in that** the solid substance contains another substance, in particular fullerene or nanotubes which absorbs irradiating electromagnetic waves.

142. The method according to any one of claims 119 to 139, **characterised in that** the solid substance contains another substance, in particular fullerene or nanotubes, which contain one or more further substances, which absorb irradiating electromagnetic waves.
143. The method according to any one of claims 119 to 142, **characterised in that** the solid or immobilised substance is pulverised, in particular after it has been deep-frozen.
144. The method according to any one of claims 119 to 143, **characterised in that** the substance which is solid or to be immobilised is electrostatically charged prior to the immobilisation.
145. The method according to any one of claims 119 to 144, **characterised in that** the pulverised substance in the solid state is nebulised above the support, in particular in deep-frozen form.
146. The method according to any one of claims 119 to 145, **characterised in that** the pulverised substance in the solid state is nebulised above the support and protected from vaporisation or sublimation with a removable cover.
147. The method according to any one of claims 119 to 146, **characterised in that** pulverised substances containing different molecules for linking to the support are applied to the support in the solid state.
148. The method according to any one of claims 119 to 147, **characterised in that** pulverised substances containing different molecules for linking to the support are

applied in the solid state to the removable cover and this cover is placed on the support.

149. The method according to any one of claims 119 to 148, **characterised in that** charged substances according to claim 144 are thereby bound to selected parts of the support at which an opposite charge is present.
150. The method according to claim 149, **characterised in that** the local charging of specific parts of the support is accomplished by applying a voltage.
151. The method according to claim 149, **characterised in that** the local charging of selected parts of the support is accomplished by irradiation with electromagnetic waves.
152. The method according to any one of claims 119 to 151, **characterised in that** the substances applied to the support are fixed by irradiation with electromagnetic waves, in particular laser light.
153. The method according to any one of claims 119 to 151, **characterised in that** the substances released locally on the support are fixed by irradiation with electromagnetic waves, in particular laser light.
154. The method according to any one of claims 119 to 151, **characterised in that** the substances applied to the support are fixed chemically.
155. The method according to any one of claims 119 to 151, **characterised in that** the substances released locally on the support are fixed chemically.



156. The method according to any one of claims 119 to 151, **characterised in that** the substances applied to the support are fixed thermally.
157. The method according to any one of claims 119 to 151, **characterised in that** the substances released locally on the support are fixed thermally.
158. The method according to any one of claims 119 to 151, **characterised in that** the substances applied to the support are fixed by applying an electrical voltage.
159. The method according to any one of claims 119 to 151, **characterised in that** the substances released locally on the support are fixed by applying an electrical voltage.
160. The method according to any one of claims 119 to 159, **characterised in that** the molecules for linking to the support which are contained in the pulverised or immobilised substance, are alkylation, biotinylation, glycolysation, phosphorylation or halogenation reagents.
161. The method according to any one of claims 119 to 159, **characterised in that** the molecules for linking to the support which are contained in the pulverised or immobilised substance, can link to thiols or the epsilon amino groups of lysines.
162. The method according to any one of claims 119 to 159, **characterised in that** the molecules for linking to the support which are contained in the pulverised or immobilised substance, contain organic molecules, in particular heterocycles, aromatic groups, aldehyde groups, keto groups, imidisol groups, sugars, lipids, esters, phosphate groups or peptide bonds.

163. The method according to any one of claims 119 to 159, **characterised in that** the molecules for linking to the support which are contained in the pulverised or immobilised substance contain cofactors, in particular haem, biotin, coenzyme-A, retinal or chlorophyll.
164. The method according to any one of claims 119 to 159, **characterised in that** the molecules for linking to the support which are contained in the pulverised or immobilised substance can undergo a chemical reaction, in particular an addition reaction, an elimination reaction, a substitution reaction, a rearrangement reaction or an attachment reaction with substances already bound on the support.
165. The method according to any one of claims 119 to 159, **characterised in that** the molecules for linking to the support which are contained in the pulverised or immobilised substance, catalyse a chemical reaction, in particular an addition reaction, an elimination reaction, a substitution reaction, a rearrangement reaction or an attachment reaction of other substances with molecules already bound on the support.
166. The method according to any one of claims 119 to 165, **characterised in that** selected regions on the support are irradiated with electromagnetic waves, in particular light, in particular with repeated pulsed laser light, in such a manner that in selected regions the solid substance is made mobile whereby the molecules included in the solid substance can link to the support.
167. The method according to any one of claims 119 to 166, **characterised in that** substances which have not been made mobile and which have not been linked are washed

from the support with solvent, preferably heated solvent.

168. The method according to any one of claims 119 to 167, **characterised in that** substances which have not been made mobile and which have not been linked are removed mechanically from the support, in particular using an air flow.
169. The method according to any one of claims 119 to 168, **characterised in that** the substances which have been made mobile are activated monomers, dimers or trimers of D- or L-amino acids.
170. The method according to any one of claims 119 to 169, **characterised in that** the substances which have been made mobile are activated monomers, dimers or trimers of natural amino acids or multimers of natural amino acids which need not necessarily be component parts of natural proteins, in particular 4-hydroxyproline, hydroxylysine, desmosine, isodesmosine, epsilon-N-methyl lysine, epsilon-N-trimethyl lysine, methyl histidine, homocystein, homoserine, citrulline, ornithine, canavanine, Djenkolic acid,  $\beta$ -cyanoalanine, cystine or glutathione.
171. The method according to any one of claims 119 to 169, **characterised in that** the substances which have been made mobile are activated monomers, dimers or trimers of synthetic amino acids which are not component parts of natural proteins.
172. The method according to any one of claims 169 to 171, **characterised in that** the activated amino acids or amino acid derivatives are linked to the support after being made mobile by standard methods.

173. The method according to any one of claims 119 to 168, **characterised in that** the activated monomers, dimers or trimers are nucleosides or their mirror images.
174. The method according to any one of claims 119 to 168, **characterised in that** the activated monomers, dimers or trimers are derivatised nucleosides or their mirror images, in particular precursors of actimer synthesis.
175. The method according to claim 174, **characterised in that** the activated nucleosides or derivatised nucleosides are linked to the support after being made mobile by standard methods.
176. The method according to any one of claims 119 to 175, **characterised in that** the linking reactions are carried out successively with different or the same further activated monomers, dimers or trimers, in particular with activated D or L amino acids or with activated nucleosides, their derivatives or their mirror images.
177. The method according to any one of claims 119 to 176, **characterised in that** after a first cycle of linking reactions, protective groups are cleaved by standard methods with the result that in particular free amino groups or hydroxyl groups are formed to which further activated monomers, dimers or trimers can link.
178. The method according to any one of claims 119 to 177, **characterised in that** one or more further cycles of linking reactions extend the molecules bound on the support by further monomers, dimers or trimers.
179. The method according to any one of claims 119 to 177, **characterised in that** one or more further cycles of

not necessarily identical reactions modify the molecules bound on the support.

180. The method according to any one of claims 119 to 179, **characterised in that** after synthesis has been carried out, the protective groups are cleaved from the synthesised oligomers, wherein the synthesised molecules remain bound on the support.
181. The method according to claim 118, **characterised in that** before applying the molecules to be anchored, a substance which is solid at the respective ambient temperatures is applied to the support and that this substance is fused for anchoring the molecules.
182. The method according to any one of claims 119 to 181, **characterised in that** the support is a compact disk.
183. The method according to any one of claims 119 to 182, **characterised in that** an array of detectors and/or an array of light sources is fixed on the support.
184. The method according to any one of claims 182 to 183, **characterised in that** the support is divided into different regions, in particular 20 different regions in the peptide synthesis, and that for each of these regions a different standard synthesis is carried out, in particular a standard peptide synthesis with 20 different activated amino acid derivatives containing fMoc protective groups.
185. The method according to any one of claims 182 to 183, **characterised in that** the support is divided into different regions, in particular respectively one region for each molecule used according to any one of claims 169 to 172 and that for each of these regions a different synthesis is carried out, in particular a

standard peptide synthesis with further different activated amino acid derivatives containing fMoc protective groups wherein the sequence of the synthesis steps need not begin or end with a specific type of molecules according to any one of claims 169 to 172.

186. The method according to any one of claims 182 to 185, **characterised in that** each of the different regions specified in claim 184 is again divided into different regions so that in particular 400 different regions are formed in the peptide synthesis and that for each of these regions a different standard synthesis is carried out, in particular a standard peptide synthesis using 20 different activated amino acid derivatives containing fMoc protective groups.
187. The method according to any one of claims 182 to 185, **characterised in that** each of the different regions specified in claim 184 is again divided into different regions so that in particular 400 different regions are formed in the peptide synthesis and that for each of these regions a different standard synthesis is carried out, in particular a standard peptide synthesis using 20 different activated amino acid derivatives containing fMoc protective groups. of the different regions specified in claims 184 to 186 is again divided into different regions so that in particular a plurality of different regions is formed in the peptide synthesis and that for each of these regions a different standard synthesis is carried out, in particular a standard peptide synthesis using 20 different activated amino acid derivatives containing fMoc protective groups or a standard synthesis using molecules to any one of claims 169 to 172.

188. The method according to any one of claims 182 to 187, **characterised in that** the division of the support into different regions, in particular into one region in each case for each molecule used, according to the manner presented in one or more of claims 184 to 187 is repeated many times, wherein the division need not necessarily contain the same number of regions in each step.
189. A method for lithographic application of a molecule library onto a support **characterised in that** a compact disk is used as the support.
190. The method for lithographic application of a molecule library **characterised in that** the support according to any one of claims 108 to 115 is fixed on an array of microlasers.
191. The method according to claims 189 or 190 **characterised in that** reactive groups, in particular free amino groups, carboxyl groups, thiol groups or hydroxyl groups are blocked with protective groups which can be cleaved by electromagnetic waves.
192. The method according to any one of claims 189 to 191, **characterised in that** selected regions are irradiated with electromagnetic waves so that light-cleavable protective groups are cleaved.
193. The method according to any one of claims 189 or 190, **characterised in that** a protective layer sensitive to electromagnetic waves is applied to the support.
194. The method according to any one of claims 189, 190 or 193, **characterised in that** after the irradiation of selected regions of the support by electromagnetic waves, the protective layer sensitive to

electromagnetic waves can be removed at the irradiated regions.

195. The method according to any one of claims 189 or 190, **characterised in that** the support is electrostatically charged or magnetised at selected regions by the irradiation by electromagnetic waves, in particular laser light.
196. The method according to any one of claims 189, 190 or 195, **characterised in that** the support is brought in contact with electrically charged or magnetised activated monomers, dimers or trimers.
197. The method according to any one of claims 189, 190, 195 or 196, **characterised in that** non-linked activated monomers, dimers or trimers are washed away, newly-selected regions of the support are electrostatically charged or magnetised by the irradiation by electromagnetic waves and the support is then brought in contact with other electrically charged or magnetised activated monomers, dimers or trimers.
198. The method according to any one of claims 189, 190, 195, 196 or 197, **characterised in that** the process described in claims 195 to 197 is repeated, in particular for 20 different activated amino acid derivatives, protective groups are cleaved and a new synthesis cycle is carried out.
199. The method according to any one of claims 189, 190 or 195, **characterised in that** magnetised or electrically charged substances containing the different molecules to be linked to the support are applied to the support.



200. The method according to any one of claims 189, 190 or 195 or 199, **characterised in that** magnetised or electrically charged substances containing the different molecules to be linked to the support are applied to a removable cover and this cover is placed on the support.
201. The method according to any one of claims 189, 190, 195, 199 or 200, **characterised in that** different molecules to be linked to the support are applied to the support together with magnetised or electrically charged substances.
202. The method according to any one of claims 189, 190, 195, 199, 200 or 201, **characterised in that** different molecules to be linked to the support are applied to a removable cover together with magnetised or electrically charged substances and this cover is placed on the support.
203. The method according to any one of claims 189 or 190, **characterised in that** different molecules to be linked to the support are applied to the support by means of a printer, in particular an ink-jet printer.
204. The method according to claim 203, **characterised in that** the substances applied to the support are fixed according to any one of claims 152 to 159.
205. A method for directing electromagnetic waves (6), in particular laser light, onto a support (12), in particular onto a support which can be used in a method according to any one of the preceding claims, **characterised in that** selected regions (7) of the support (12) are rapidly and reproducibly irradiated with positional accuracy, that the selected regions (7) of the support (12) are loaded or will be loaded

with different molecules (2) or with different aggregates of these molecules (4), that the different molecules (2) or the aggregates of these molecules (4) interact with other molecules (8), that the different molecules (2) or the aggregates of these molecules (4) or the other molecules (8) located on the selected regions (7) interact with the irradiating electromagnetic waves (6) and that due to the interaction of the irradiating electromagnetic waves (6) with the molecules (2) or with aggregates of these molecules (4) or with the other molecules (8), local physical processes are set in motion.

206. Apparatus for detecting a luminescence reaction of molecules (50, 52) bound on a support (48), in particular biological or biologically relevant molecules, comprising means, in particular at least one laser (42, 44), for directing electromagnetic waves (62) onto the support and at least one detector (56, 58) for detecting any luminescence reactions of the irradiated molecules, **characterised in**

- that the means (42, 44) for directing the waves are configured to produce short electromagnetic wave pulses and
- that the means are coupled to the detector/detectors (56, 58) in such a manner that the detector/detectors does not detect any luminescence reactions produced during the emission of a wave pulse

207. Apparatus for detecting a luminescence reaction of molecules (50, 52) bound on a support (48), in particular biological molecules, comprising means, in particular at least one laser (42, 44), for directing electromagnetic waves (62) onto the support and at

least one detector (56, 58) for detecting any luminescence reactions of the irradiated molecules, **characterised in**

- that the means (42, 44) for directing the waves are coupled to the detector/detectors (56, 58)
- that at least the predominant part of the waves (62) generated by the means are not detected by the detector/detectors (56, 59).

208. Apparatus for detecting a luminescence reaction of molecules (14) bound on a support (12), in particular biological or biologically relevant molecules, comprising means, in particular at least one laser, for directing electromagnetic waves (62) onto the support and at least one detector (28) for detecting any luminescence reactions of the irradiated molecules, **characterised in**

- that means (42, 44) are provided for moving the support relative to the detector and to the means for directing the electromagnetic waves, in such a manner
- that regions of the support irradiated by electromagnetic waves can be moved out of and into the detection range of the detector after the irradiation by the waves.

209. The apparatus according to claim 208 **characterised in that** the support (14) is rotatably mounted.

210 The apparatus according to any one of claims 206 to 209 **characterised in that** at least one wavelength filter (60) is connected between support (46) and detector (56, 58).

211. The apparatus according to any one of claims 206 to 210 **characterised in that** at least one optical imaging system is provided between the support and the detector and/or between the support and the exciting light source.
212. The apparatus according to claim 211 **characterised in that** the optical imaging system comprises at least one lens system or an array of lens systems.
213. The apparatus according to claim 211 or 212 **characterised in that** the optical imaging system contains at least one optical grating.
214. The apparatus according to any one of claims 211 to 213 **characterised in that** the optical imaging system comprises at least one optical mirror or an array of optical mirrors.
215. The apparatus according to any one of claims 211 to 214 **characterised in that** the optical imaging system comprises optical fibres or an array of optical fibres.
216. The apparatus according to any one of claims 211 to 215 **characterised in that** the optical imaging system comprises at least one graded-index lens system or an array of graded-index lens systems.
217. The apparatus according to any one of claims 206 to 216 wherein at least one excitation light source is used to emit the electromagnetic waves **characterised in that** support and excitation light source are fixed relative to one another.

218. The apparatus according to any one of claims 206 to 217 wherein at least one excitation light source is provided to emit the electromagnetic waves **characterised in that** an array of excitation light sources that is fixed on the support is provided as the excitation light source.
219. The apparatus according to any one of claims 206 to 218 wherein at least one excitation light source is provided to emit the electromagnetic waves **characterised in that** support, excitation light source and detector are fixed relative to one another.
220. The apparatus according to any one of claims 206 to 219 **characterised in that** an array of specifically excitable sources of electromagnetic radiation, in particular an array of microlasers or light-emitting diodes, is attached to the support.
221. The apparatus according to any one of claims 206 to 220 **characterised in that** an array (54) of detectors (56, 58) is provided.
222. The apparatus according to any one of claims 206 to 221 **characterised in that** detectors (56, 58), support (48) and excitation light sources (42, 44) are fixed relative to one another.
223. The apparatus according to any one of claims 206 to 222 **characterised in that** a mixed array of microlasers or light-emitting diodes and/or detectors is provided to excite the molecules for detecting specific optical properties and as a detector for detecting those properties.
224. Apparatus for detecting optical properties of molecules bound on a support, in particular biological

molecules, comprising means for directing electromagnetic waves onto the support and a detector for observing the irradiated molecules, **characterised in**

- that means are provided for separating selected molecules.

225. The apparatus according to claim 224 **characterised in that** a detector of a second type is provided by which means specific properties of the separated molecules can be detected.

226. The apparatus according to claim 225 **characterised in that** the detector of the second type is a spectrometer, in particular a mass spectrometer.

227. The apparatus according to any one of claims 224 to 2226 **characterised in that** the means for separating comprise a laser.

228. The apparatus according to claim 227 **characterised in that** the power of the laser is controllable.

229. A support (12) for molecules (14), in particular biological molecules, in particular for use in a method according to any one of claims 1 to 205, **characterised in**

- that the support has integrated position markings (20).

230. The support according to claim 229, **characterised in that** the position markings (20) can be detected by an opto-electronic scanning system.

231. The support according to claim 230, **characterised in that** the support is a substantially commercially-available compact disk (12), a digital video disk or a magneto-optical disk.
232. The support according to any one of claims 229 to 231, **characterised in that** the support is configured to be transparent.
233. The support according to any one of claims 229 to 232, **characterised in that** the position markings (20) can be detected by the optoelectronic scanning system of a substantially commercially-available CD drive.
234. The support according to any one of claims 229 to 233, **characterised in that** a peptide library, in particular a preferably complete 4-, 5-, 6- or 7mer peptide library is applied to the support.
235. The support according to any one of claims 229 to 233, **characterised in that** an oligonucleotide library, in particular a preferably complete 12-, 13-, 14- or 15mer oligonucleotide library is applied to the support.
236. The support according to any one of claims 229 to 233, **characterised in that** an aptamer library is applied to the support.
237. Apparatus for applying molecules to a substantially flat surface of a support, in a particular a support according to any one of claims 229 to 236, **comprising**
- means for rotatable holding of the support about an axis of rotation substantially perpendicular to the said surface of the support,

- means for applying various fluids to the surface of the support in the region of the axis of rotation and
- at least one laser which can be moved relative to the support for irradiating selected regions of the support with laser light.

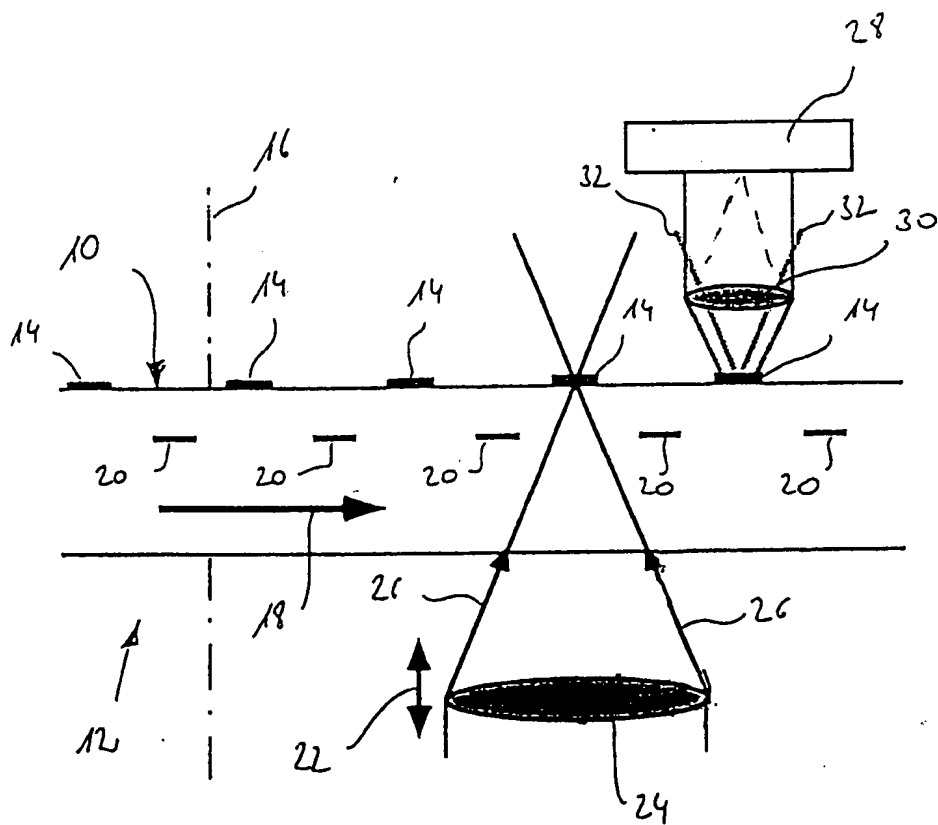
238. Apparatus for applying molecules to a substantially flat surface of a support, in a particular a support according to any one of claims 229 to 236, **comprising** nozzle-like means for applying extremely small amounts of molecules to be anchored on the support, means for moving the means for applying the molecules and the support relative to one another and at least one laser for irradiating selected regions of the support with laser light.



REFERENCE LIST

- 2 Molecules linked to the support
- 3 Matrix later
- 4 Aggregates which bind molecules linked to the support
- 5 Substances
- 6 Electromagnetic waves
- 7 Locally narrowly delimited selected region
- 8 Other molecules which react with molecules (2) linked to the support or with aggregates to these molecules
- 9 Immobilised substances
- 10 Upper side
- 11 Substances which have been made mobile
- 12 Support
- 13 Electromagnetic waves or applied voltage
- 14 Molecule
- 15 Different substances
- 16 Axis
- 17 Mixed array
- 18 Movement arrow
- 19 Sources of electromagnetic radiation
- 20 Pit
- 21 Insulator
- 22 Movement arrow
- 23 Array of individually controllable detectors
- 24 Focusing lens
- 25 Larger region comprising a plurality of selected regions (7)
- 26 Laser beams
- 27 Detector
- 28 Detector
- 29 Light-emitting diode which can be simultaneously used as a detector
- 30 Lens
- 32 Emitted light beams

40	Array of microlasers
42	Microlaser
44	Microlaser
46	Upper side of a support
48	Support
50	Molecule/group
52	Molecule/group
54	Array of detectors
56	Detector
58	Detector
60	Wavelength filter
62, 62'	Excitation radiation (radiation of a microlaser)
64	Luminescence radiation



**Fig. 1**

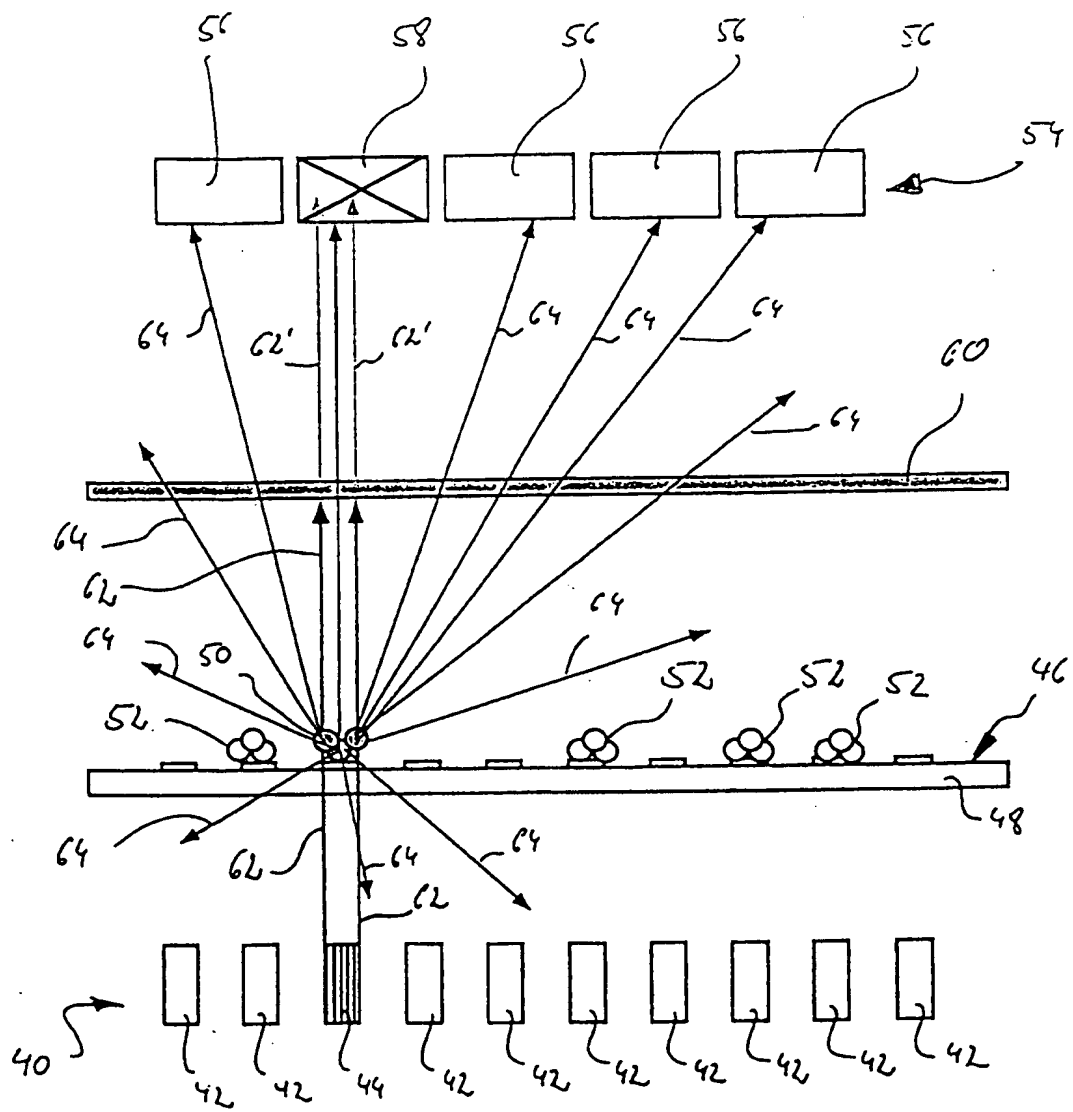


Fig. 2

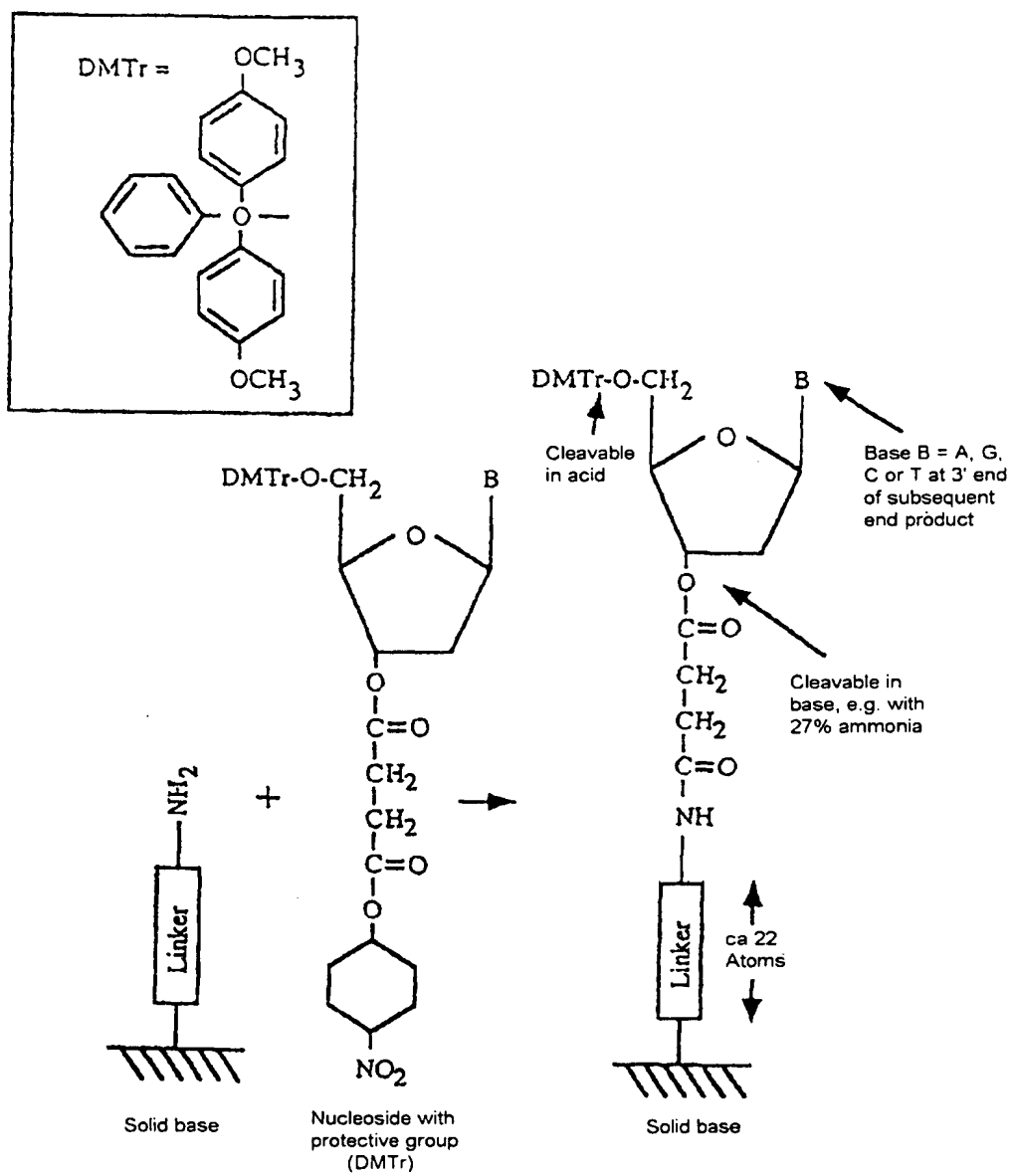
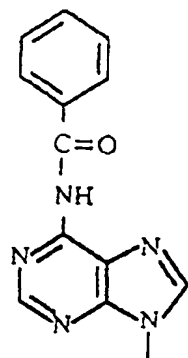
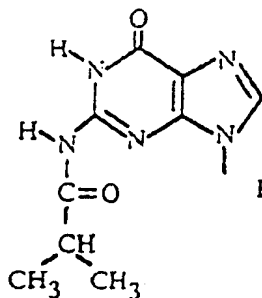


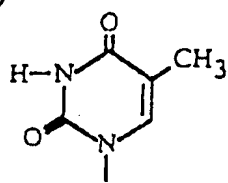
Fig. 3



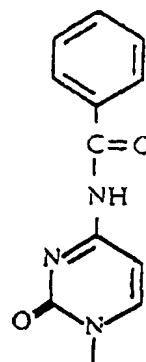
A(Bz) = Adenine  
with benzoyl  
protective group



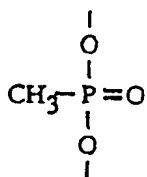
G(Ib) = Guanine  
with isobutyryl  
protective group



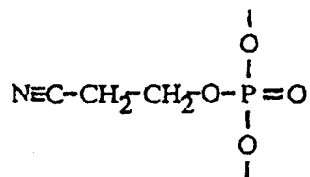
T = Thymine



C(Bz) = Cytosine  
with benzoyl  
protective group



Phosphate group  
with methoxy  
protective group



Phosphate group  
with  
beta-cyanoethyl  
protective group

Fig. 4

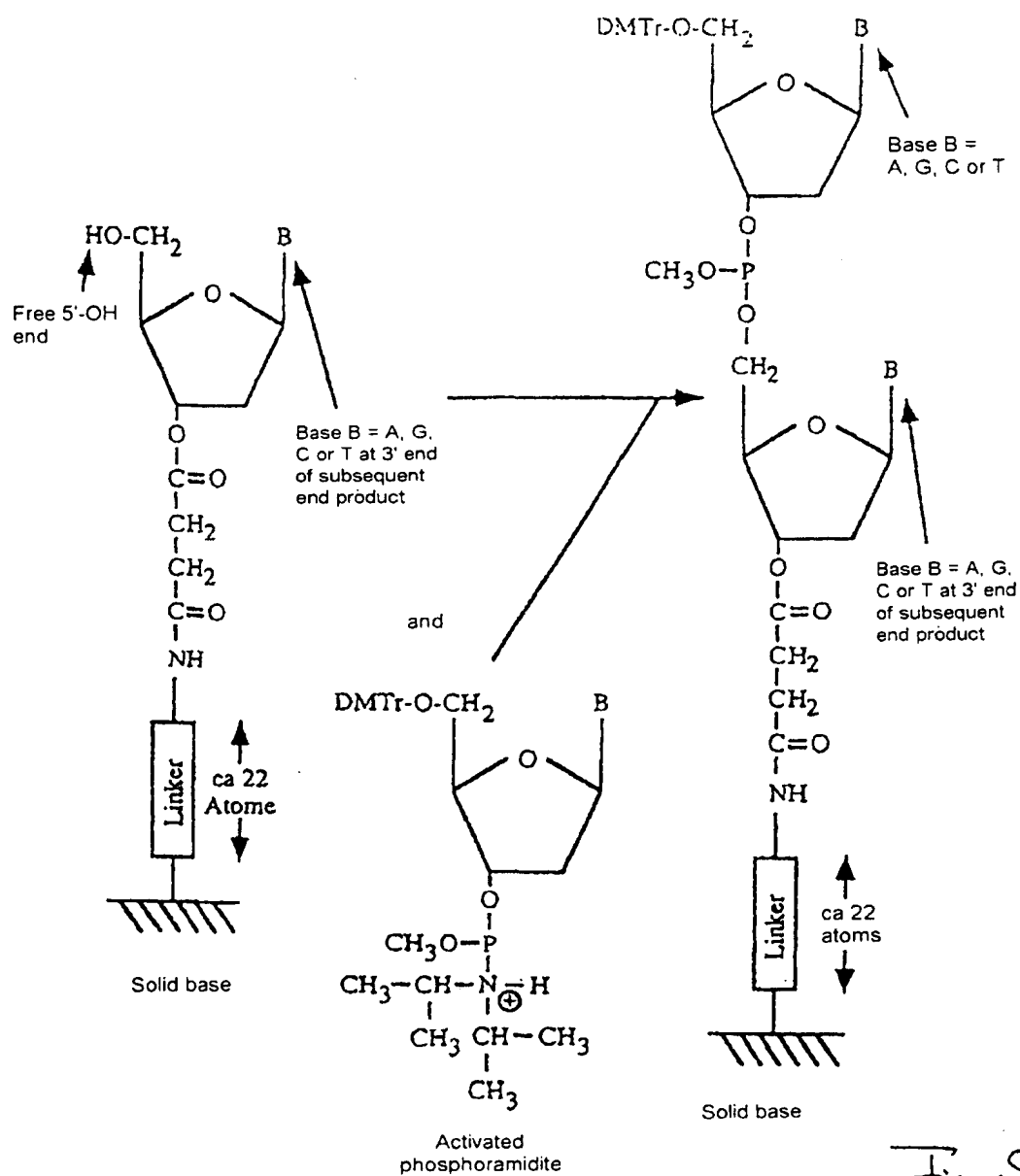


Fig. 5

6/15

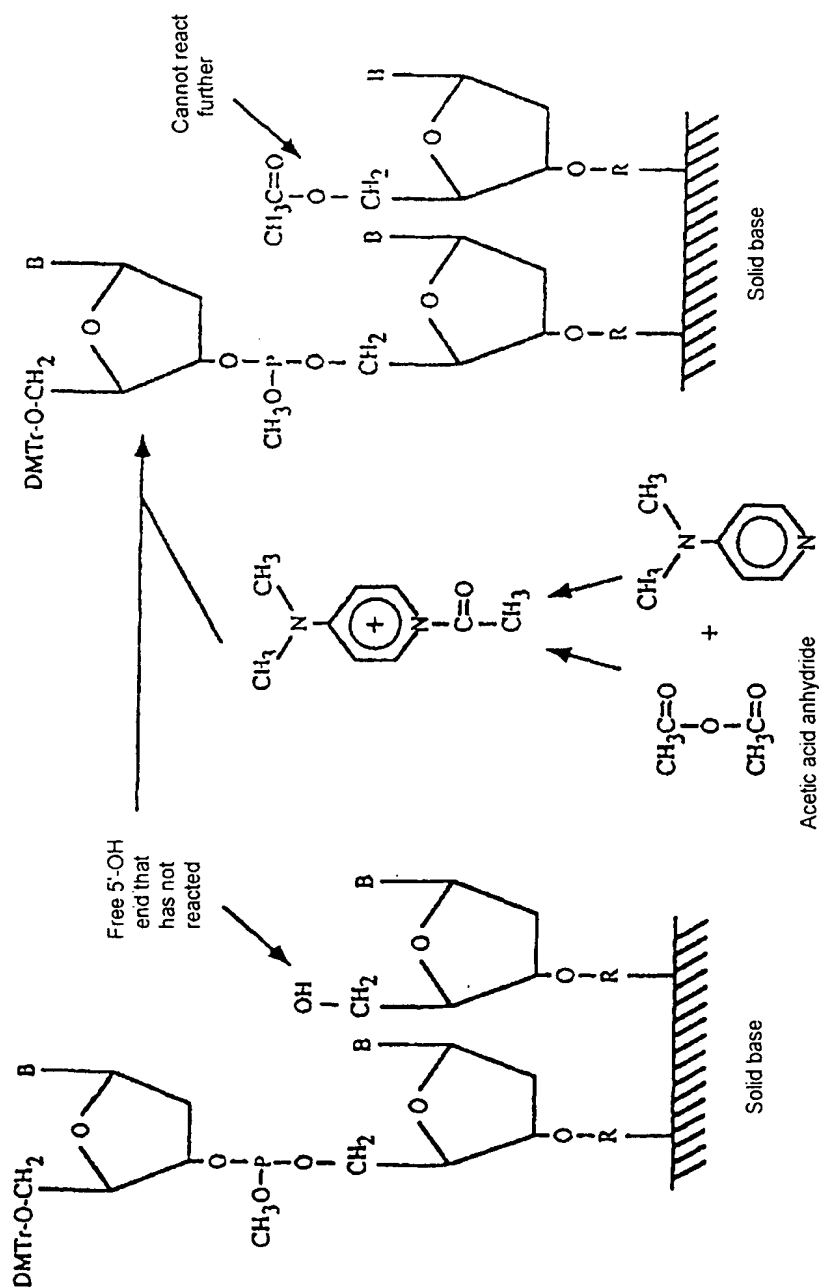


Fig. 6



7/15

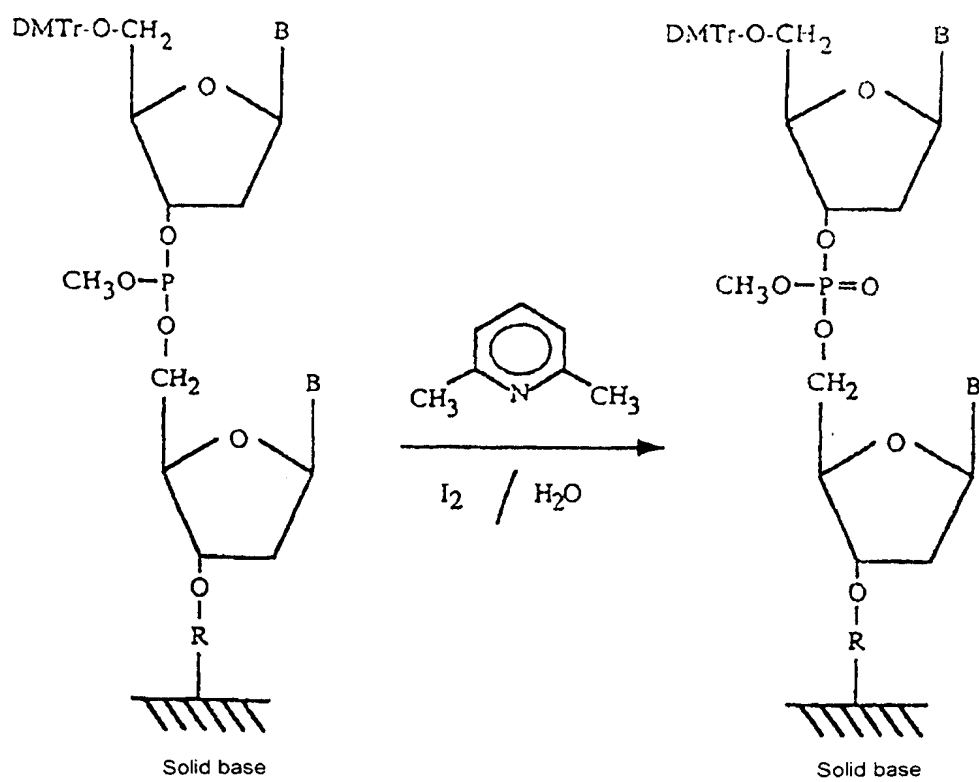


Fig. 7

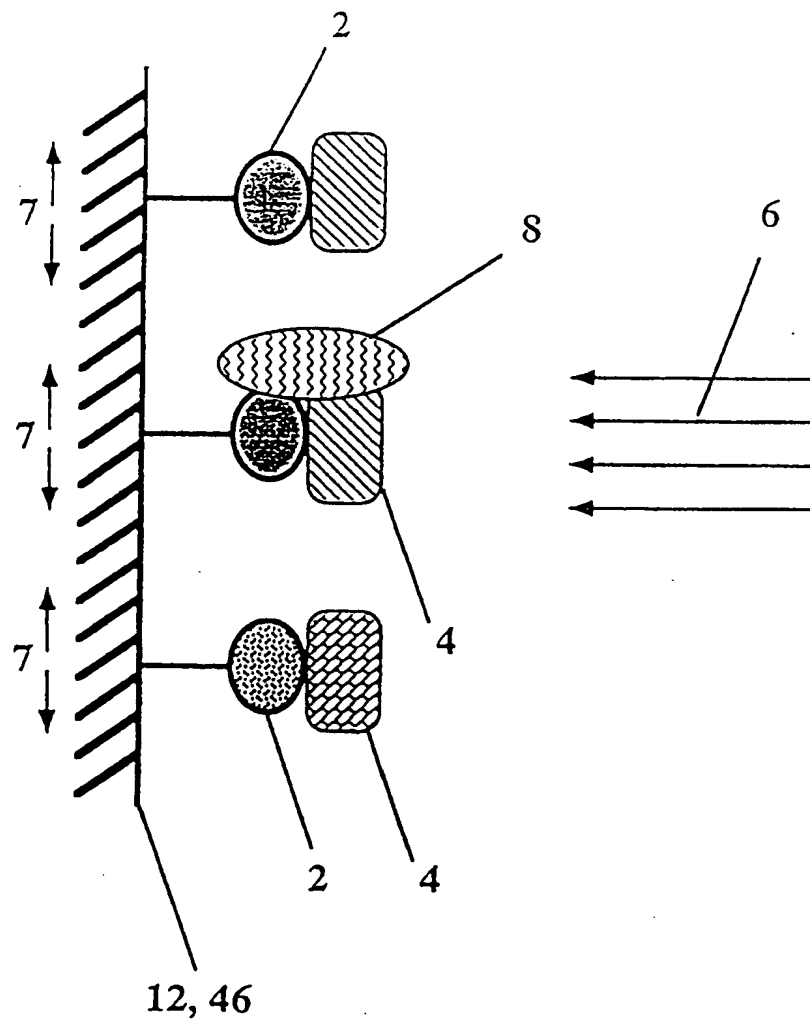


Fig. 8

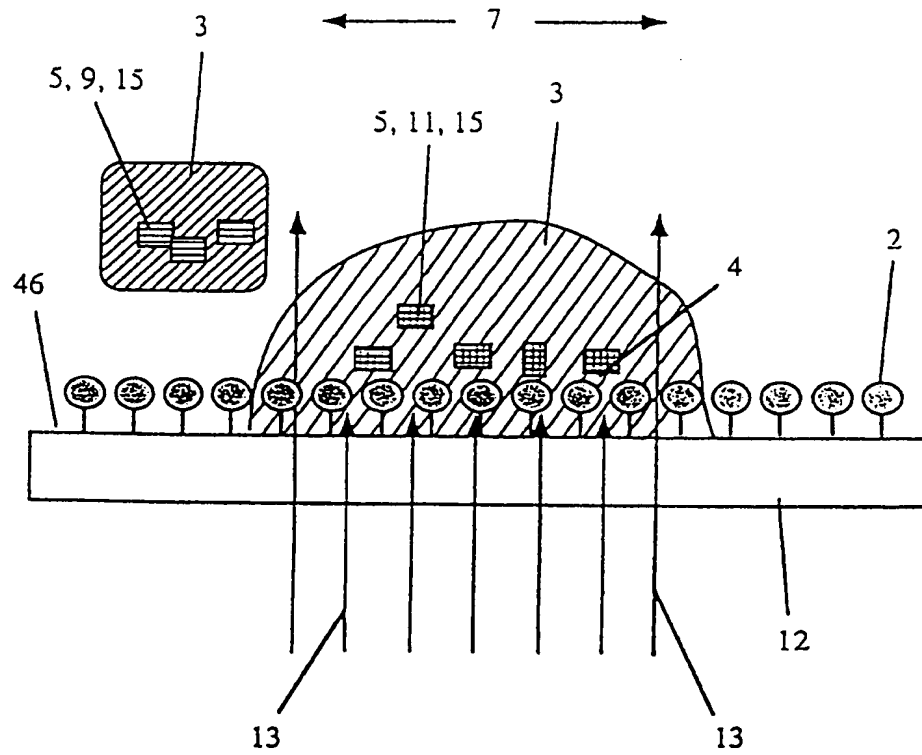


Fig. 9

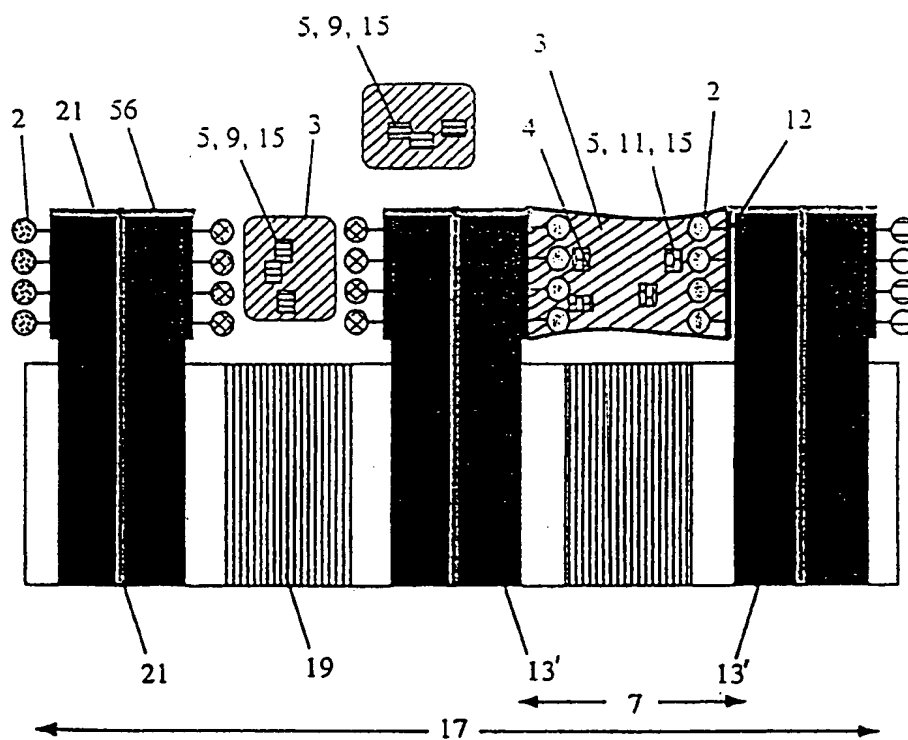


Fig. 10

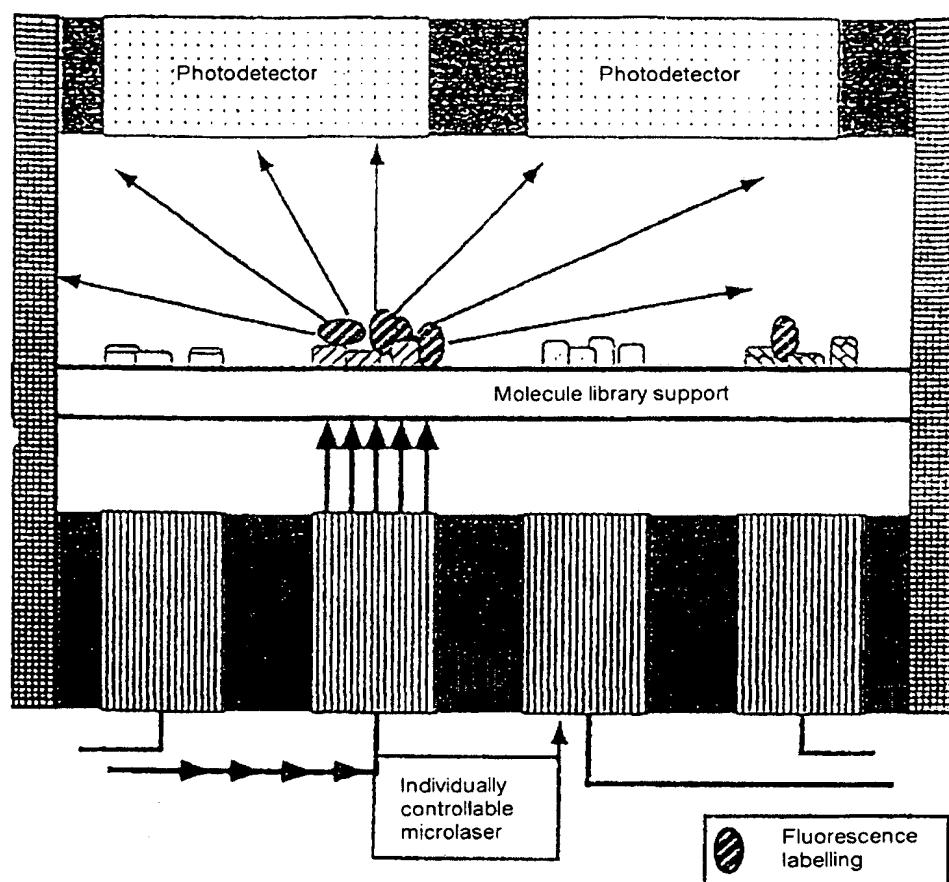


Fig 11

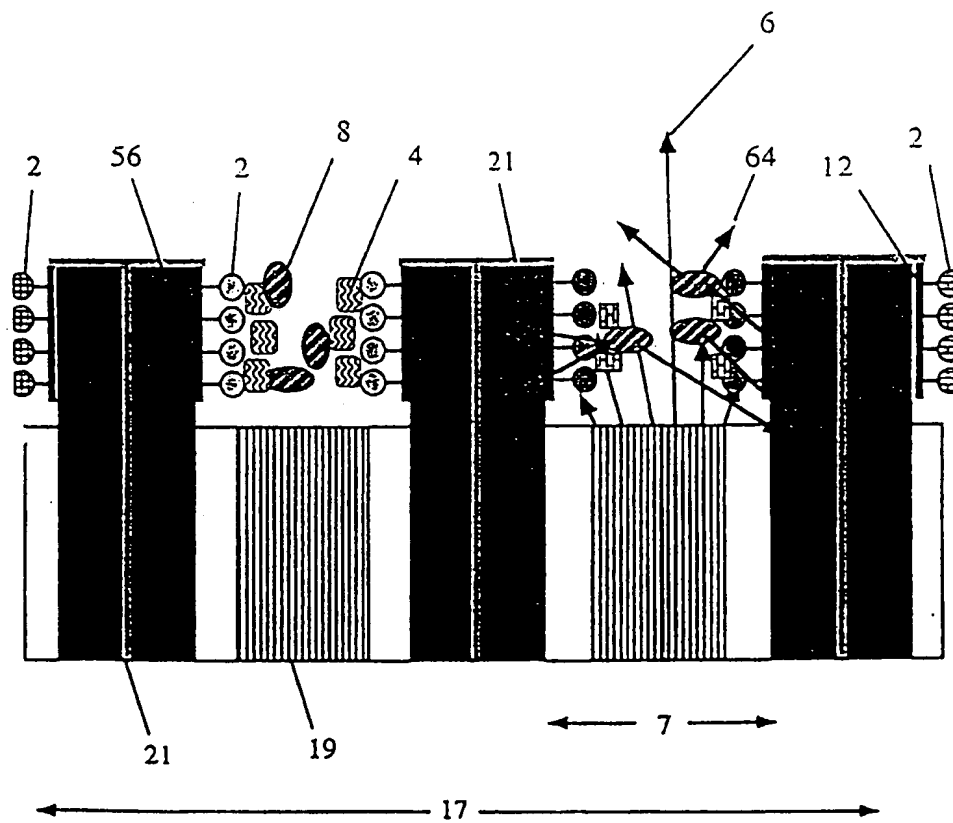


Fig. 12

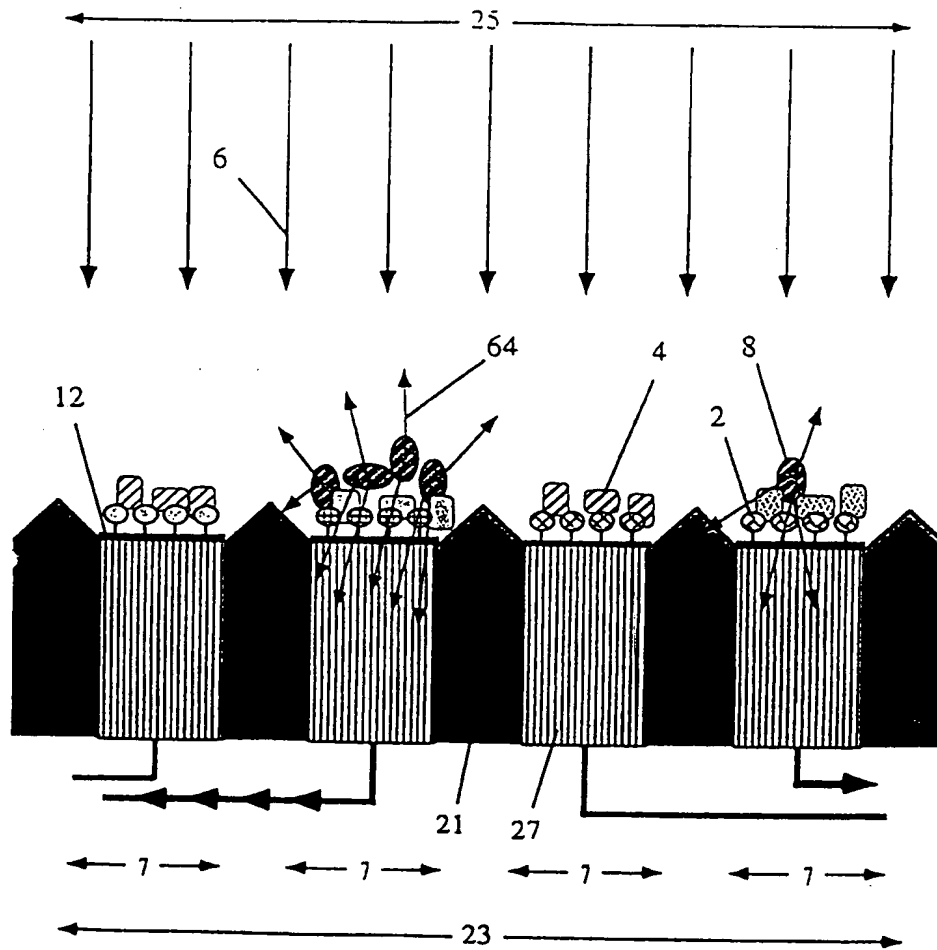


Fig. 13

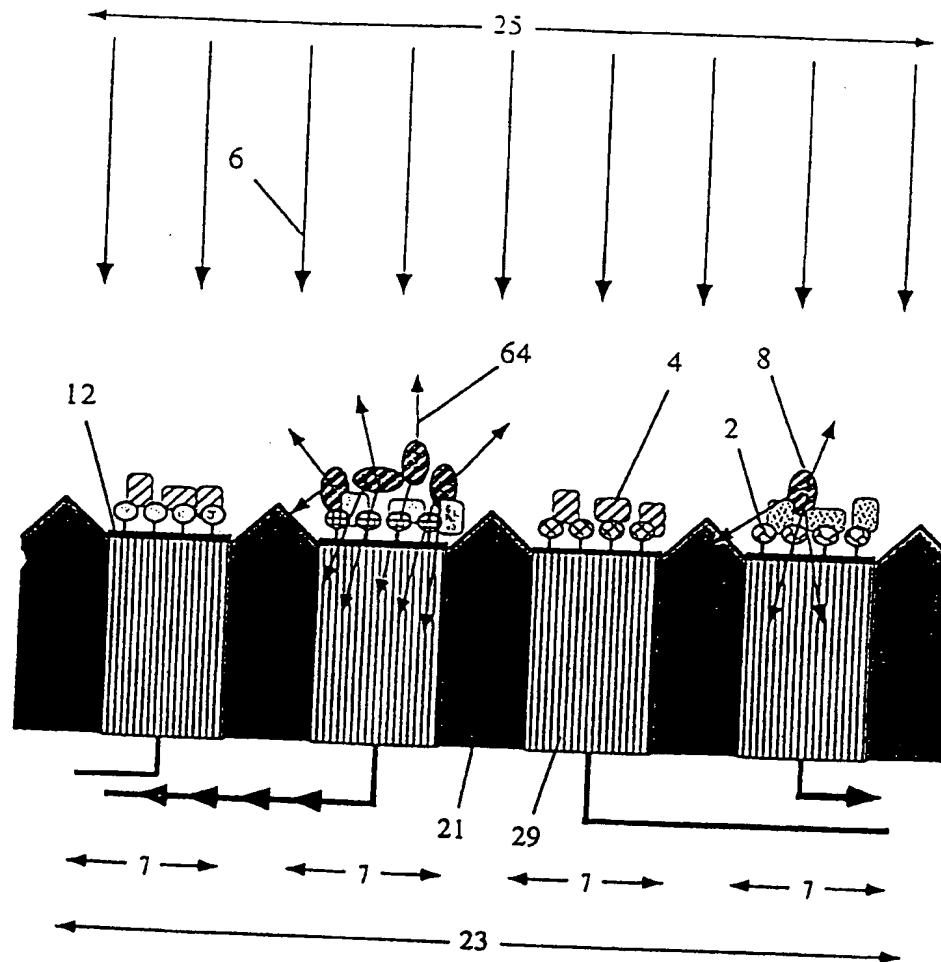


Fig. 14



15/15

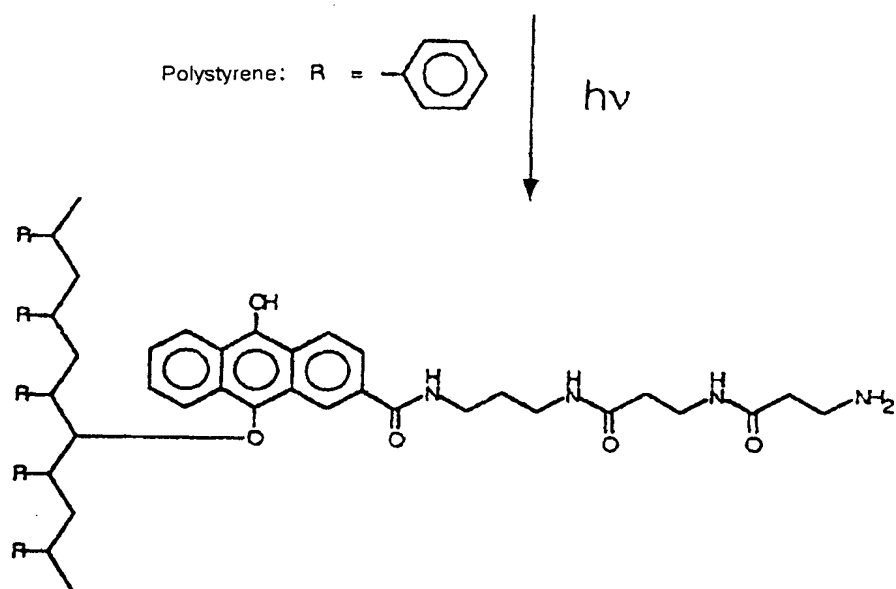
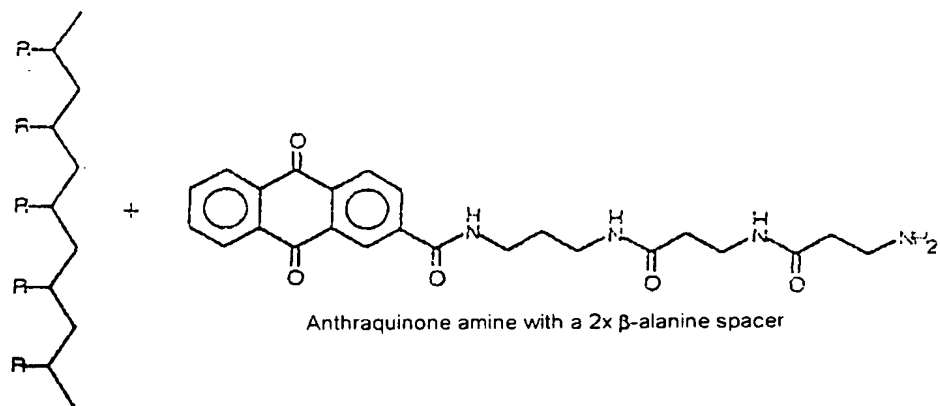
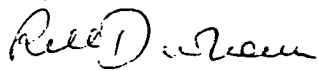


Fig. 15

**CERTIFICATION OF TRANSLATION**

I, Rosamund Durham s/o Technical Translation  
Agency GmbH, Fasengarten 8, A-2136 Laa/Thaya  
AUSTRIA am the  
translator of the documents attaches and certify that the following is a true  
translation to the best of my knowledge and belief.

  
Signature of translator

dated this 27th day of August 2010